

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



**MEDIDORES INFLAMATORIOS IMPLICADOS EN LA
TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL
EXPERIMENTAL**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Jesús Pradillo Justo

Bajo la dirección de los doctores
María Ángeles Moro Sánchez, Olivia Hurtado Moreno e Ignacio Lizasoain
Hernández

Madrid, 2008

• **ISBN: 978-84-692-1095-6** **© Jesús Pradillo Justo, 2008**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
Departamento de Farmacología



**MEDIADORES INFLAMATORIOS IMPLICADOS EN LA
TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL EXPERIMENTAL**

Memoria de tesis para optar al Grado de Doctor con mención

Europea por:

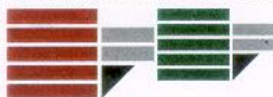
Jesús Miguel Pradillo Justo

Directores de tesis:

Prof. María Ángeles Moro Sánchez

Dra. Olivia Hurtado Moreno

Prof. Ignacio Lizasoain Hernández



Arcavacata di Rende 14th March 2008

TO WHOM IT MAY CONCERN

I am writing in support of the research work of Jesús Miguel Pradillo, a PhD student working in the Department of Pharmacology at the Complutense University of Madrid (Spain) under the supervision of Prof Ignacio Lizasoain and Prof. María A. Moro. To this end I have gone carefully through the summary of his PhD thesis and reached the conclusions reported in the following paragraphs.

The introductory section clearly identify the need and sets well the scenario under which the research hypothesis has been generated. In particular, this section of the summary is mainly focussed on the current knowledge concerned with the mechanisms underlying the phenomenon of ischemic tolerance induced in well defined animal models of brain ischemia and it emerges clearly that mechanisms concerned with excitotoxicity may act in conjunction with mediators of neuroinflammation and these need to be investigated thoroughly.

The section dealing with the methods used is described clearly. Brain ischemia and preconditioning are induced in rats and mice using well established techniques and standard western blotting and immunofluorescence methods are employed to the scope of the research work.

The sequence used for the presentation of the results generated makes it easier for the reader to follow the rational behind the mechanisms underlying ischemic tolerance. Thus, the western blotting and immunofluorescence data demonstrate that up-regulation of TACE, TNF α , TNFR1 and NF-kB pathway is implicated in the mechanism of ischemic tolerance in view of the reversal of neuroprotection under



Dipartimento FARMACO BIOLOGICO

conditions of inhibition of this pathway. Increased expression of the neuronal and glial glutamate transporters has also been clearly demonstrated though the EAAT-3 seems the one specifically modulated by the TACE/ $\text{TNF}\alpha$ /TNFR1/NF- κ B pathway. The latter transcription factor is also implicated in the reported induction of players of neuroinflammatory mechanisms such as iNOS, COX2 and MMPs, known to be implicated in the damage caused to the brain under ischemia. This pathway has also been studied here though the activation mechanisms implicated TLR4.

Altogether, I consider the scope of whole research programme more than justified on the ground of our current need of knowledge in an area in continuous development. The methodological approach is instrumental to the educational training and endowed with the due complexity for the area of interest. Although I have not gone through the whole thesis, the data generated seem to have developed a critical approach in the student. The results yielded may well form the basis for further development of the research work.

I have no hesitation to indicate the candidate more the mature to obtain the degree of PhD in the European Community academia and research area.

Faithfully

Giacinto Bagetta, MD

Professor of Pharmacology

Chairman of The PhD course in

Pharmacology in Biochemistry of Cell Death

Professor John Garthwaite
Wolfson Institute for Biomedical Research
University College London
The Cruciform Building
Gower Street
London WC1E 6BT

Direct Line + 44 (0)20 7679 6694
Facsimile + 44 (0)20 7209 0470
email john.garthwaite@ucl.ac.uk
Website <http://www.ucl.ac.uk/wibr>

15th April 2008

To Whom It May Concern:

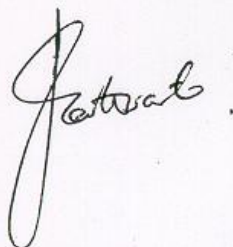
Report on the research of Jesus M Pradillo.

Mr Pradillo's research has concerned the mechanisms that are put into operation in the brain as a result of a brief period of interrupted blood supply (ischaemia). It is well accepted that such a stimulus, not damaging in itself, is able to exert substantial protection against subsequent periods of ischaemia of a severity that normally causes major loss of brain tissue. Knowledge of the biological processes set in motion by the "ischaemic preconditioning" may provide openings for new approaches for reducing the damage resulting from stroke and other neurodegenerative conditions.

The research is undoubtedly in a difficult but important area. An impressive variety of different techniques have been adopted, including molecular biology, immunohistochemistry and, most importantly, in vivo models of stroke. The candidate has made significant advances from a number of perspectives. A particular focus has been on a signalling pathway involving tumour necrosis factor. Although commonly regarded as a damaging agent (implicit in its name), the work showed that the enzyme that makes tumour necrosis factor, and a receptor on which it acts, become more abundant following ischaemic conditioning. Furthermore, by pharmacological and other approaches, evidence was obtained that the pathway participated importantly in the protective mechanism. The next step was to investigate what the pathway might be doing to confer protection and it was found that one its effects was to help increase the amounts of a protein that transports glutamate into cells. The significance of this finding is that the build-up of glutamate outside cells and the consequent excessive activation of glutamate receptors on the cell surface of neurones is widely considered to contribute to neurodegeneration in stroke and other conditions. Increasing the transport of glutamate would therefore be expected to be protective. Finally, the possibility that inflammatory mechanisms might participate was investigated by examining so-called toll-like receptors. Mice missing one of the receptors were shown to have a significantly reduced level of protection. In addition, levels of a number of downstream mediators were found to be reduced in such mice. Again, this evidence suggests that pathways often thought of as being damaging may also be critical in conferring protection.

Overall, the thesis represents a substantial body of new information on the mechanisms protecting the brain from ischaemia and raises many intriguing issues for future research on this topic. Two papers have already been published in high quality journals, attesting to the work's originality and interest, and a further publication seems likely in the near future. My opinion is that the research is of a high quality and that the candidate fully merits the award of a PhD.

Yours truly,



ABREVIATURAS

- ADAM: Desintegrina y metaloproteasa. A disintegrin and a metalloprotease.
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AIT: Ataque isquémico transitorio
- AMPA: 2-amino-3-(hidroxi-5-metil-5-metilisoxazol-4-il) propionato
- AMPc: Adenosin-monofosfato cíclico
- AP1/AP2: Proteína activadora 1/2. Activator protein 1/2
- ARN: Ácido ribonucleico
- ARNm: ARN mensajero
- ATP: Adenosin-trifosfato
- BAFF: Factor activador de células B perteneciente a la familia de TNF. B cell activating factor belonging to the TNF family
- Bax: Proteína asociada a Bcl-2. Bcl-2-associated protein
- Bcl-2: B-cell leukemia/lymphoma 2
- BSA: Seroalbúmina bovina. Bovine serum albumin
- CCA: Arteria carótida común. Carotid common artery
- CCAO: Oclusión de la arteria carótida común. Carotid common artery occlusion. tCCAO: CCAO transitoria
- CDRs: Dominios ricos en cisteína
- COX: Ciclooxygenasa
- CRE: Elementos de respuesta a cAMP
- CREB: Proteínas de unión a elementos de respuesta a cAMP
- Cy-2/3: Cianina 2/3
- DAMPs: Patrones moleculares asociadas al daño celular. Damage-associated molecular patterns
- DD: Dominio de muerte. Death domain
- DED: Dominio efector de muerte. Death effector domain
- E.E.M.: Error estándar de la media
- EAAC1: Transportador de aminoácidos excitadores 1. Excitatory amino acids carrier 1. También llamado EAAT3

- EAAT: Transportador de aminoácidos excitadores. Excitatory amino acids transporter
- ERK: Quinasa regulada por señal extracelular. extracellular signal-regulated kinase
- ERNs: Especies reactivas de nitrógeno
- EROs: Especies reactivas de oxígeno
- FADD: Dominio de muerte asociado a Fas. Fas-associated death domain
- FSC: Flujo sanguíneo cerebral
- GABA: Ácido gamma aminobutírico. Gamma aminobutyric acid
- GCF2: Factor controlador del crecimiento. Growth rate controlling factor-2
- GFAP: Proteína ácida fibrilar de la glía. Glial fibrillary acidic protein
- GLAST: Transportador de glutamato y aspartato. Glutamate and aspartate transporter. También llamado EAAT1
- GLT-1: Transportador de glutamato 1. Glutamate transporter 1. También llamado EAAT2
- GLUT-1: Transportador de glucosa 1. Glucose transporter 1.
- GTP: Guanosin-trifosfato.
- GTRAP: Proteínas asociadas a los transportadores de glutamato
- HIF-1: Factor de transcripción inducible por hipoxia. Hypoxia-inducible factor 1
- HSP: Proteína de choque térmico. Heat shock proteins
- IAPs: Proteínas inhibidoras de apoptosis.
- ICAM-1: Moléculas de adhesión intercelular de tipo 1
- ICV: Inyección intracerebroventricular
- IgG: Inmunoglobulina G
- I κ B α : Proteína inhibitoria del factor κ B alfa. Inhibitory protein (I)-kappa B alpha
- IKK: Quinasa de I κ B. I kappaB kinase.
- IL: Interleuquina
- IRAK: Kinasa asociada al receptor de IL. IL-receptor associated kinase
- IRF: Factor regulador de interferon. Interferon regulator factor

- K_{ATP}: Canales de potasio dependientes de ATP
- kDa: Kilodalton
- LPS: Lipopolisacárido
- LRR: Dominio rico en leucina. Leucin rich domain
- LT: Linfotóxina
- MAPK: Quinasa de las proteínas activadas por mitógenos. Mitogen-activated protein kinase
- MCAO: Oclusión de la arteria media cerebral. Middle Cerebral Artery Occlusion
- MEK: Quinasa de MAP/ERK. MAPK/ERK kinase
- mGluR: Receptores metabotrópicos de glutamato. Metabotropic glutamate receptors
- MMPs: Metaloproteasas de matriz
- MnSOD: Superóxido dismutasa dependiente de manganeso. Superoxide dismutase [Mn]
- mTNF- α : TNF- α unido a membrana. También llamado pro- TNF- α
- MyD88: Factor de diferenciación mieloide 88. Myeloid differentiation factor 88
- NADH: Nicotina adenina dinucleótido
- NeuN : Núcleo de neuronas. Neuronal nuclei
- NF κ B: Factor nuclear κ B. Nuclear factor κ B.
- NGF: Factor de crecimiento nervioso. Nerve growth factor
- NIK: Quinasa inductora de NF κ B. NF κ B inducing kinase
- NINDS: National institute of neurological disorders and stroke
- NMDA: N-metil-D-aspartato
- NO: Óxido nítrico. Nitric oxide.
- NOS: Óxido nítrico sintasa. Nitric oxide synthase. eNOS: NOS endotelial; iNOS: NOS inducible; nNOS: NOS neuronal
- ODN: Oligodeoxinucleótido
- O.M.S: Organización Mundial de la Salud
- PA: activador del plasminógeno

- PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos. Pathogen-associated molecular patterns.
- PBS: Tampón fosfato salino. Phosphate buffer saline
- PCI: Precondicionamiento isquémico cerebral.
- PI: Precondicionamiento Isquémico
- PI3K: Fosfatidil inositol 3 quinasa
- pK: proteína quinasa
- PKB/Akt: Protein-quinasa B. Protein kinase B.
- PLAD: Dominio de ensamblaje previo a la unión de ligando
- pMCAO: MCAO permanente. Permanent MCAO
- PMN: Células polimorfonucleares
- POG: Privación de oxígeno y glucosa
- PPAR γ : Receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ . Peroxisome proliferator activated receptor gamma.
- PVDF: Difluoruro de polivinilideno. Polyvinylidene difluoride
- RANK(L): (Ligando del) receptor activador de NF κ B. Receptor activator of nuclear factor kappa B (ligand).
- RIP: Proteína de interacción con el receptor. Receptor interacting protein
- rpm: Revoluciones por minuto
- rt-PA: activador del plasminógeno tisular recombinante. Recombinant tissue plasminogen activator
- sTNF- α : TNF- α soluble
- SNC: Sistema nervioso central
- SOD: Superóxido dismutasa
- SODD: Proteína silenciadora de dominio de muerte. Silencer of death domain.
- Sp1: Proteína específica (factor de transcripción). Specific protein
- TACE: Enzima convertidora de TNF- α . TNF- α converting enzyme.
- THD: Dominio de homología de TNF. TNF homology domain
- TI: Tolerancia isquémica
- TIR: Dominio del receptor Toll/IL. Toll/IL receptor domain

- TIRAP: Proteína asociada al receptor Toll/IL. Toll/IL receptor-associated protein
- TLR: Receptor Toll-like. Toll-like receptor
- tMCAO: MCAO transitoria. Transient MCAO
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral α . Tumor Necrosis Factor alpha
- TNFR: Receptor del factor de necrosis tumoral.
- TRADD: Dominio de muerte asociado al receptor de TNF- α . TNF- α receptor associated death domain.
- TRAF: Factor asociado al receptor de TNF. TNFR associated factor
- TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand. Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF
- TRAM: Molécula adaptadora relacionada con TRIF. TRIF-related adaptor molecule
- TRIF: Factor activador de interferon asociado al receptor Toll. TIR associated domain and IFN inducer
- TTC: Cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio
- U.A: Unidades arbitrarias
- VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular. Vascular endothelial growth factor.
- VGLUT: Transportador de glutamato vesicular. Vesicular glutamate transporter.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR (Pag. 1)

1.1.1 Definición e importancia (Pag. 1)

1.1.2 Clasificación de la enfermedad cerebrovascular (Pag. 2)

1.1.3 Factores de riesgo (Pag. 4)

1.1.4 Tratamiento y prevención (Pag. 5)

1.1.5 Fisiopatología del *ictus* isquémico: (Pag. 6)

1.1.5.1 Excitotoxicidad por glutamato (Pag. 15)

1.1.5.1.1 Fisiología del glutamato en el SNC (Pag. 15)

1.1.5.1.2 Características del transporte de glutamato (Pag. 18)

1.1.5.1.3 Excitotoxicidad por glutamato en la isquemia (Pag. 24)

1.1.5.2 La inflamación y la inmunidad en la isquemia cerebral (Pag. 27)

1.1.5.2.1 Neuroinflamación como proceso para recuperar el tejido (Pag. 27)

1.1.5.2.2 Daño por neuroinflamación en la isquemia cerebral (Pag. 28)

1.1.5.2.3 Papel de la inmunidad innata (TLRs) en la isquemia cerebral (Pag. 33)

1.2 PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PCI) Y TOLERANCIA ISQUEMICA (TI) CEREBRALES (Pag. 38)

1.2.1 Historia y definición (Pag. 38)

1.2.2 Modelos experimentales, caracterización y tipos de TI (Pag. 40)

1.2.3 Mecanismos bioquímicos implicados en el PCI (Pag. 43)

1.2.4 Expresión clínica de la TI (Pag. 51)

1.3 VÍAS DE NEUROPROTECCIÓN ENDÓGENA: TACE, TNF- α y TLR4 (Pag. 52)

1.3.1 TNF- α y superfamilia de TNF (Pag. 52)

1.3.2 Señalización por TNF- α a través de sus receptores (Pag. 54)

1.3.3 TNF- α y su enzima convertidora (Pag. 57)

1.3.4 Posible papel de TLR4 en la TI (Pag. 59)

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS (Pag. 61)

3. MATERIALES Y MÉTODOS (Pag. 64)

3.1. Sujetos de experimentación (Pag. 64)

BLOQUE I

3.2. Modelos experimentales de preconditionamiento isquémico e isquemia cerebrales en rata (Pag. 64)

3.2.1. Modelo de PCI focal (Pag. 64)

3.2.2. Modelo de isquemia cerebral focal (Pag. 66)

3.3. Administración y características de diferentes herramientas farmacológicas: (Pag. 67)

3.3.1. Inyección intracerebroventricular (Pag. 67)

3.3.2. Administración subcutánea (Pag. 70)

3.4. Grupos experimentales (rata) (Pag.70)

3.4.1. Grupos experimentales para los análisis de expresión
protéica (Pag. 70)

3.4.2. Grupos experimentales para la determinación de TI (Pag.
72)

**3.5 Determinación del volumen de infarto y caracterización
neurológica** (Pag. 73)

3.5.1. Determinación del volumen de infarto (Pag. 73)

3.5.2. Caracterización neurológica después de pMCAO. (Pag. 74)

3.6. Obtención y procesamiento de muestras de cerebro (Pag. 75)

3.7. Determinaciones moleculares: (Pag. 76)

3.7.1. Determinaciones moleculares por western blot. (Pag. 76)

3.7.2. Determinaciones moleculares mediante doble
inmunofluorescencia.(Pag.77)

BLOQUE II

3.8. Modelos experimentales de preconditionamiento isquémico e isquemia cerebrales en ratón: (Pag. 79)

3.8.1. Modelo de PCI global en ratón. (Pag. 79)

3.8.2. Modelo de isquemia cerebral focal en ratón. (Pag. 80)

3.9. Grupos experimentales (ratón) (Pag. 81)

3.9.1. Grupos experimentales para la determinación de la tolerancia isquémica cerebral (Pag. 81)

3.9.2. Grupos experimentales para la determinación de la expresión proteica (Pag. 82)

3.10. Determinación del volumen de infarto y caracterización neurológica después del PCI y la pMCAO (Pag. 83)

3.10.1. Determinación del volumen de infarto (Pag. 83)

3.10.2. Caracterización neurológica (Pag. 84)

3.11. Obtención y procesado de muestras de cerebro (Pag. 84)

3.12. Determinaciones moleculares por western blot (Pag. 85)

3.13. Reactivos y análisis estadístico (Pag. 86)

4. RESULTADOS (Pag. 87)

RESULTADOS DEL BLOQUE I

4.1 Efecto de un modelo in vivo de PCI sobre el volumen de infarto y la TI en rata (Pag. 87)

4.2. Expresión y localización celular de TACE tras el PCI (Pag. 88)

4.3. Estudio de la expresión de TNFR1 tras el PCI (Pag. 90)

4.4 Efecto del PCI sobre la localización celular de TNFR1 (Pag. 91)

4.5. Estudio del efecto del PCI sobre la activación de NF- κ B (Pag. 93)

4.6. Efecto de la inhibición de la vía TACE/TNF/TNFR1/NF- κ B sobre el volumen de infarto y sobre la TI (Pag. 94)

4.7. Estudio del efecto del PCI y de la inhibición de la vía TACE/TNF/TNFR1/NF- κ B sobre los déficits motores después de la pMCAO (Pag. 96)

4.8. Efecto del PCI sobre la expresión de EAAC1/EAAT3 (Pag. 98)

4.9. Efecto del PCI y de la inhibición de la vía TACE/TNF/TNFR1/NF- κ B sobre la localización celular de EAAT3 (Pag. 99)

4.10. Expresión de EAAT3 tras el PCI y tras la inhibición de NF- κ B (Pag. 101)

4.11. Efecto del PCI sobre la expresión de GLAST/EAAT1 (Pag. 102)

4.12. Efecto del PCI sobre la expresión de GLT-1/EAAT2 (Pag. 103)

RESULTADOS DEL BLOQUE II

4.13. Efecto de un modelo in vivo de PCI sobre el volumen de infarto y la TI en ratón (Pag. 104)

4.14. Papel de TLR4 sobre el volumen de infarto y la TI (Pag. 105)

4.15. Efecto de TLR4 sobre los déficits motores después del PCI (Pag. 106)

4.16. Efecto de TLR4 sobre la expresión de iNOS tras el PCI (Pag. 108)

4.17. Papel de TLR4 sobre la expresión de COX-2 después del PCI (Pag. 109)

4.18. Efecto de la activación de TLR4 sobre la expresión de MMP9 tras el PCI (Pag. 110)

4.19. Papel de TLR4 sobre la activación de NF- κ B 18h después del PCI (Pag. 111)

5. DISCUSIÓN (Pag. 113)

- **Bloque I: La vía TACE/TNF- α y los mecanismos de recaptación de glutamato están implicados y relacionados en los fenómenos de PCI a través de mecanismos comunes como la activación de NF- κ B (Pag. 113)**

- Bloque II: TLR4 media la TI a través de mecanismos inflamatorios y a través de la activación de NF- κ B. (Pag. 124)

6. CONCLUSIONS (Pag. 130)

7. SUMMARY (Pag. 132)

8. BIBLIOGRAFÍA (Pag. 141)

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD CEREBROVASCULAR

1.1.1. Definición e importancia.

Se conoce como Enfermedad Cerebrovascular el trastorno del flujo sanguíneo cerebral que altera de forma transitoria o permanente la función de una determinada región del cerebro.

Desde que Hipócrates reconociera y denominara a esta patología “apoplejía”, que en griego significa ataque violento, históricamente la enfermedad cerebrovascular ha recibido diferentes denominaciones. Una de ellas, ha sido el término *ictus*, término procedente del latín que significa “golpe” y refiriéndose de nuevo a la repentina parálisis sufrida por el enfermo. Finalmente, otros términos sinónimos son ataque cerebral, infarto cerebral, hemorragia o derrame cerebral. También se conoce con el término anglosajón “stroke”.

La importancia de la enfermedad cerebrovascular reside en que es la causante de una de cada 10 muertes de los 55 millones que ocurren al año en todo el mundo, siendo la tercera causa de muerte a nivel mundial, después de la enfermedad coronaria y el cáncer (O.M.S. 2003). En España, al igual que lo que ocurre en el resto del mundo occidental y según un informe del Instituto Nacional de Estadística (2006), esta patología es la segunda causa de muerte a nivel global (32.887 muertes de las 371.478 producidas en 2006), la tercera en los hombres, y la primera en mujeres. Además, es la causa más importante de invalidez o discapacidad a largo plazo en el adulto, la segunda causa de demencia, y consume un 3-4% del gasto sanitario (Alvarez Sabin et al., 2006).

1.1.2. Clasificación de la enfermedad cerebrovascular.

Desde 1990 se han producido muchos avances en las técnicas de imagen cerebral y vascular, lo que ha permitido un mejor diagnóstico y clasificación de la enfermedad cerebrovascular. Debido a la complejidad de esta patología, su clasificación depende de los siguientes factores: naturaleza de la lesión, tamaño y morfología de la misma, forma de instauración y evolución posterior, topografía, mecanismo de producción y etiología.

Por este motivo se han realizado muchas clasificaciones de la enfermedad cerebrovascular siendo una de las más relevantes, las realizadas por el *National Institute of Neurological Disorders and Stroke* (NINDS,1990), estando en vigor la correspondiente al año 1990. Otras clasificaciones también muy utilizadas son por ejemplo la clasificación Laussane, la clasificación Badisen (también llamada TOAST), ha sido creada por la Sociedad Española de Neurología y es la que se emplea en nuestro país (revisar en www.badisen.net/manual.pdf).

Según la clasificación del NINDS, la Enfermedad Cerebrovascular, por su naturaleza, se puede dividir en dos: isquémica y hemorrágica (rev. en Díez-Tejedor et al., 2001); Caplan., 2003; Figura 1).

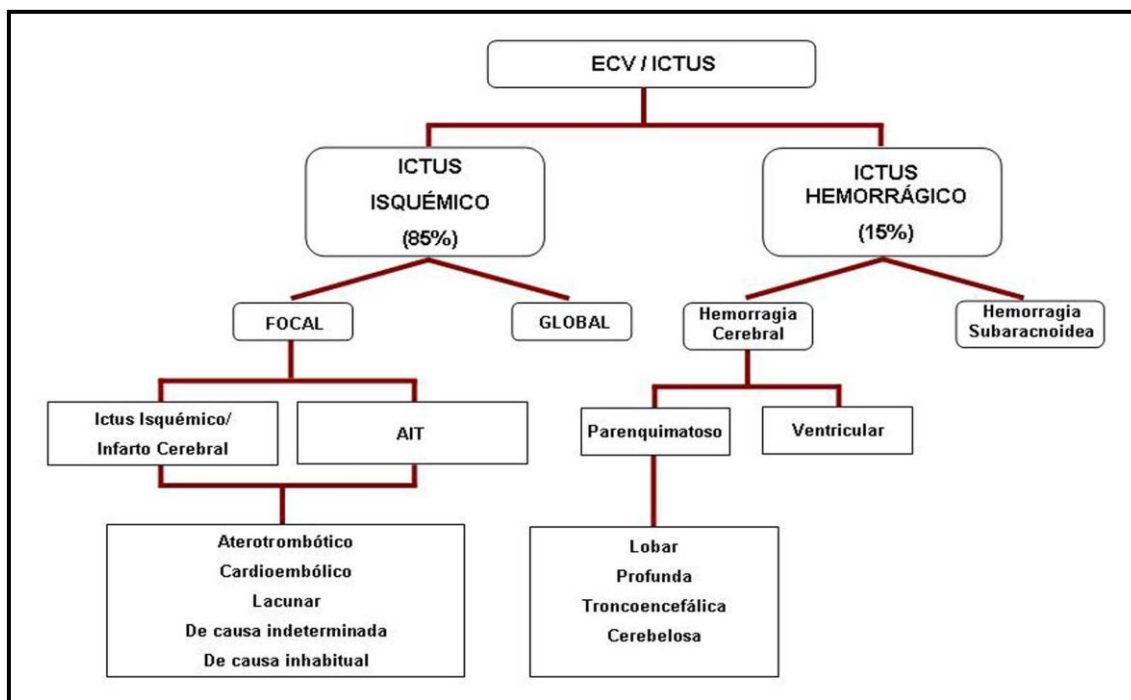


Figura 1: Clasificación de la enfermedad cerebrovascular según su naturaleza. Tomado de Díez-Tejedor et al., 2001

El Ictus Isquémico se debe a una reducción o al bloqueo completo de flujo sanguíneo en determinadas partes del cerebro, produciéndose un déficit de oxígeno y glucosa. En cambio, la Hemorragia Cerebral se produce por la ruptura de un vaso sanguíneo que libera sangre dentro del parénquima cerebral, produciendo daño. La proporción aproximada con la que se producen ambas son 85% en el caso del *ictus* isquémico frente al 15% en el caso de la hemorragia cerebral (Figura 1).

El *ictus* isquémico, dependiendo de la porción de cerebro afectada, se divide en:

Ictus Isquémico Focal: se produce por la obstrucción de un vaso por embolia o trombosis en una zona localizada del cerebro, en la cual tiene lugar la restricción completa o grave del flujo sanguíneo, y afecta a un área cuyo tamaño viene determinado por el vaso ocluido. Si la duración del proceso es menor de 24 horas, se presenta como un ataque isquémico transitorio (AIT, que será descrito más adelante con mayor detalle) de carácter reversible, sin que exista un déficit neurológico permanente tras su finalización (Diez-Tejedor et al., 2001).

Por el contrario si la obstrucción del vaso se prolonga más de 24 horas, siendo este un tiempo suficiente para producir necrosis tisular, se le denomina *ictus* isquémico o infarto cerebral establecido. La obstrucción del vaso ocasiona un gradiente de daños en la zona implicada, con una isquemia intensa en la zona que rodea al vaso afectado, denominado “núcleo necrótico” o *core*, y una zona isquémica menos pronunciada que rodea al *core* denominada zona de penumbra. Las células del núcleo necrótico reciben un flujo sanguíneo inferior a 12-10 ml/100g/min, es decir, un flujo inferior al umbral de infarto, mientras que en la penumbra, al recibir un flujo mayor, las células conservan una actividad metabólica mínima que preserva su integridad estructural durante algún tiempo (Astrup et al., 1981). De esta manera, el *ictus* isquémico establecido produce una lesión básicamente necrótica (*core* o núcleo necrótico) que configura la zona de infarto. Esta lesión se acompaña además de una extensa inflamación con edema y gliosis. La importancia de la zona de penumbra isquémica reside en que las células que han sobrevivido a la isquemia, se pueden recuperar cuando se restaura el flujo sanguíneo y mejoran las condiciones hemodinámicas (Back, 1998).

Según la causa subyacente, el *ictus* isquémico o infarto cerebral ha sido comúnmente clasificado en aterotrombótico, cardioembólico y lacunar, existiendo otras causas menos frecuentes que pueden producirlo que dan lugar a la categoría de infarto de causa inhabitual; en el caso de que no se pueda asignar a ninguna de estas categorías, se clasifica como infarto de origen indeterminado (figura 1).

Ictus Isquémico Global: se produce cuando la disminución del flujo sanguíneo se produce de manera simultánea en todo el cerebro. Afecta a los hemisferios cerebrales de forma difusa y puede estar asociada o no a una lesión del tronco encefálico y/o cerebelo. Con frecuencia es el resultado de la disminución de la circulación sistémica debido a la reducción del volumen o de la presión sanguínea, por paro cardíaco o hipotensión sistémica grave, o por la oclusión de las principales arterias que irrigan el cerebro. La isquemia global puede ser completa, cuando la reducción del flujo es total, o incompleta, cuando existe un flujo sanguíneo residual. Las consecuencias clínicas abarcan desde un déficit cognitivo leve (memoria, atención), hasta el estado vegetativo persistente por necrosis neocortical e incluso, si la duración es elevada, muerte cerebral por afectación troncoencefálica (Diez-Tejedor et al., 2001; Zemke et al., 2004).

1.1.3. Factores de riesgo

En cuanto a los factores de riesgo asociados a la Enfermedad Cerebrovascular, podemos decir que existen tres tipos (Tabla 1):

- No modificables: aquellos factores que vienen determinados en la propia persona y como indica su nombre no pueden ser modificados. De entre ellos destacan edad, sexo, raza y la herencia.
- Modificables bien establecidos: aquellos factores en los que se ha demostrado el nivel de evidencia, grado de asociación y riesgo relativo con respecto a la patología que nos ocupa. De entre ellos hay que destacar la hipertensión arterial y la diabetes *mellitus*.
- Modificables potenciales: aquellos en los que el nivel de evidencia, grado de asociación y riesgo relativo no está bien establecido. De entre ellos destacan el consumo de tabaco y alcohol y la obesidad.

FACTORES DE RIESGO PARA EL <i>ICTUS</i>		
No Modificables	Modificables bien establecidos	Modificables potenciales
<ul style="list-style-type: none"> - Edad - Sexo - Herencia - Raza - Geografía - Clima 	<ul style="list-style-type: none"> - Hipertensión arterial - Cardiopatías de alto riesgo embolígeno - Marcadores de ateromatosis - Diabetes mellitus - Ataque isquémico transitorio 	<ul style="list-style-type: none"> - Dislipemias - Tabaquismo - Alcoholismo - Obesidad - Sedentarismo - Cardiopatías de bajo-medio riesgo embolígeno - Otros: anticonceptivos orales, menopausia, migraña, etc.

Tabla 1: Factores de riesgo para el *Ictus*. Tomado de Ruíz-Giménez et al., 2002 (<http://www.msc.es/farmacia/infmedic>).

1.1.4. Tratamiento y prevención.

Como se indicó en el primer apartado de la Introducción, la enfermedad cerebrovascular constituye la tercera causa de muerte a nivel mundial y la principal causa de incapacidad a largo plazo de origen neurológico. A pesar de la importancia socioeconómica de esta patología, el tratamiento aprobado del *ictus* es muy pobre, ciñéndose a la recanalización de las arterias obstruidas y a una prevención de las recidivas.

En general se pueden distinguir tres etapas en el tratamiento del *ictus*:

- 1) Tratamiento preventivo de la enfermedad cerebrovascular (Prevención Primaria)

Las terapias para prevenir un primer episodio cerebrovascular o para evitar episodios recurrentes se basan en el tratamiento de los factores de riesgo subyacentes de la persona, tales como la hipertensión, la fibrilación atrial y la diabetes, o en prevenir la formación generalizada de coágulos que pueden ocasionar episodios cerebrovasculares isquémicos

en cada persona, independientemente de si se encuentran presentes o no factores de riesgo.

2) Tratamiento de la fase aguda del *Ictus* (Prevención secundaria)

El tratamiento para la fase aguda de un *ictus* trata de detenerlo mientras éste se está produciendo, disolviendo con rapidez el coágulo que ocasiona el *ictus* isquémico, o deteniendo la hemorragia ocasionada en el *ictus* hemorrágico. Este tratamiento suele ser farmacológico, utilizándose medicamentos antitrombóticos (anticoagulantes), trombolíticos (*rt-PA*) y neuroprotectores (Citicolina).

3) Rehabilitación del paciente con *ictus* o hemorragia cerebral

Esta fase del tratamiento consiste en ayudar a la persona que ha sufrido un *ictus* o una hemorragia cerebral a superar las incapacidades que se han desarrollado por el daño producido tras esta patología. Esta rehabilitación se dirige a intentar recuperar la falta de movilidad de los miembros que estén afectados, recuperación del equilibrio, recuperación del lenguaje, así como el intento de mejorar la sensibilidad de los miembros afectados y de la capacidad visual. Como vemos en este tratamiento van a intervenir numerosos profesionales como son el médico rehabilitador, fisioterapeutas, logopedas, terapeutas ocupacionales, etc., y como se ha dicho, la finalidad de este tratamiento es la recuperación completa del paciente.

1.1.5. Fisiopatología del *ictus* isquémico

El sistema nervioso, por sus características especiales, difiere notablemente del resto de los tejidos en lo referente a su metabolismo energético. El peso del cerebro es solamente el 2% del peso total del cuerpo pero recibe el 15% del flujo cardíaco y utiliza el 20% del oxígeno que consume todo el organismo. Las células cerebrales obtienen la energía en su totalidad por el metabolismo de la glucosa, excepto en circunstancias especiales como cetosis y ayuno prolongado, en donde la energía se obtiene a partir de los cuerpos cetónicos. La capacidad de depósito de glucosa y glucógeno del

cerebro es reducida y sólo puede cubrir los requerimientos energéticos cerebrales durante tiempos cortos. Estas diferencias con el resto de tejidos se cree que se deben a que las neuronas no funcionan de forma autónoma, sino dentro de complejos neuronales, que para su funcionamiento se integran con otras partes del sistema nervioso. Por otro lado también hay que considerar el fenómeno de la selectividad de la barrera hematoencefálica, que selecciona tanto el tipo como la velocidad de paso de moléculas desde la sangre al cerebro. Por tanto, estas características del tejido nervioso, especialmente la utilización exclusiva de glucosa y el escaso margen de almacenamiento, obliga a un estrecho acoplamiento entre perfusión, metabolismo energético y función. De esta forma, el desacoplamiento que se produce entre todos estos elementos durante el *ictus* isquémico nos explica la fisiopatología de esta enfermedad.

El flujo sanguíneo cerebral (FSC) normal en un adulto joven es de 60ml/min/100g. Cuando se produce la obstrucción de un vaso en el cerebro se van a distinguir varias regiones dentro de la zona afectada en función del FSC que reciban. Como se citó anteriormente, en el infarto cerebral se distinguen principalmente dos regiones bien diferenciadas, el *core* y la zona de penumbra. La primera zona se caracteriza por un flujo sanguíneo por debajo de 10ml/min/100g y es donde se produce una rápida muerte celular (Pulsinelli, 1992). Sin embargo, entre este núcleo intensamente isquémico y el parénquima cerebral normalmente perfundido existe una zona hipoperfundida, cuya extensión depende del mejor o peor funcionamiento de la circulación colateral (Heiss y Graf, 1994; Castillo, 2000). Dentro de esta zona se pueden distinguir dos regiones con pronóstico claramente diferenciado: una ligeramente hipoperfundida o zona oligohémica ($FSC > 22\text{ml/min/100g}$), en la que el riesgo de convertirse en infarto sólo sucede en circunstancias especialmente adversas, y otra denominada zona de penumbra isquémica, con una perfusión cerebral críticamente disminuida ($FSC < 22\text{ml/min/100g}$), pero en la que el consumo de oxígeno es todavía suficiente para preservar la supervivencia celular. La mayor parte de esta penumbra en la fase aguda del *ictus* isquémico progresará a infarto cerebral si no es controlada adecuadamente (Baron, 2001; Heiss et al., 2001). Esto conduce al concepto de ventana terapéutica, siendo ésta de 3 a 6 horas para el tratamiento agudo de la

isquemia cerebral, tiempo durante el cual la restitución del flujo y/o la inhibición de los mediadores de daño celular evitarían la progresión de esta zona de penumbra hacia infarto.

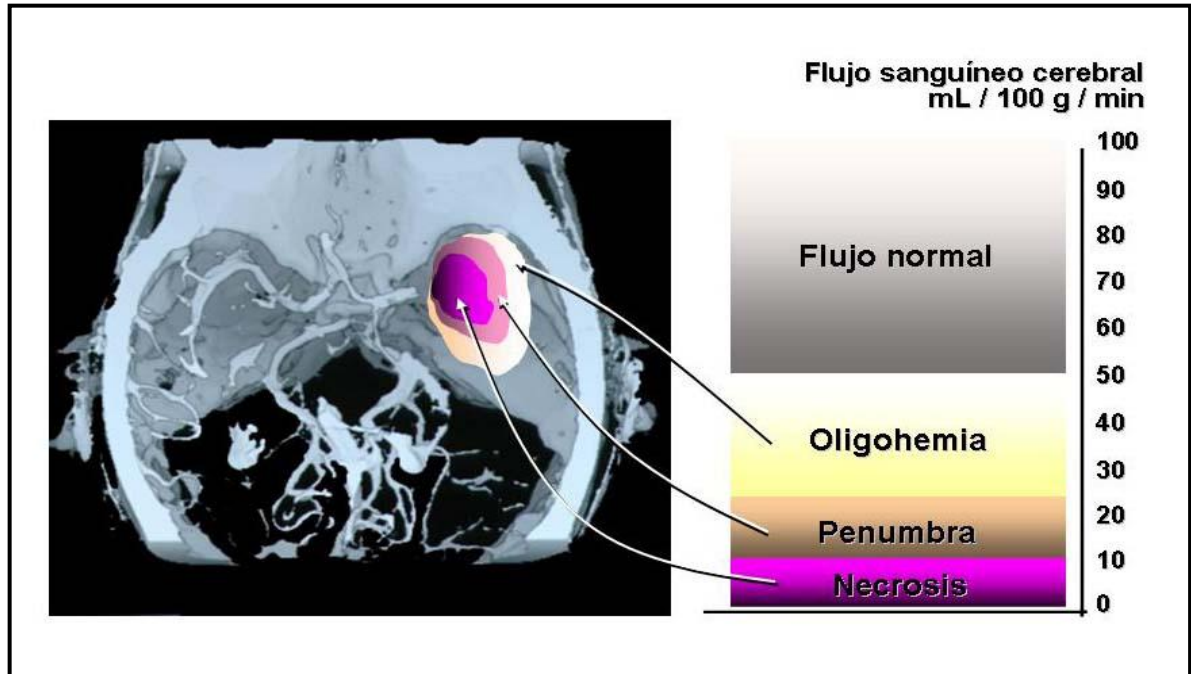


Figura 2: Diagrama de las zonas que se distinguen durante un *ictus* isquémico en función del flujo cerebral que poseen. Tomado de Castillo et al., 2001.

La isquemia cerebral desencadena una secuencia de fenómenos moleculares a corto y largo plazo que se inician con el fracaso energético relacionado con la interrupción de los procesos de fosforilación oxidativa y el déficit de producción de trifosfato de adenosina (ATP). Debido a este déficit de ATP, se produce el fallo de la ATPasa de sodio-potasio y de otras bombas iónicas dependientes de energía, lo que tiene como consecuencia la pérdida de los gradientes iónicos transmembrana. Estos sucesos constituyen el punto fundamental relacionado con los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y, especialmente, de la muerte celular en el *core* cuando la obstrucción vascular se prolonga durante unos minutos.

A partir de aquí, los procesos bioquímicos que conducen a la destrucción del parénquima cerebral serán diferentes a nivel de las neuronas, de la glía o del componente vascular, por lo que es necesario explicar estos fenómenos por separado (Figura 2).

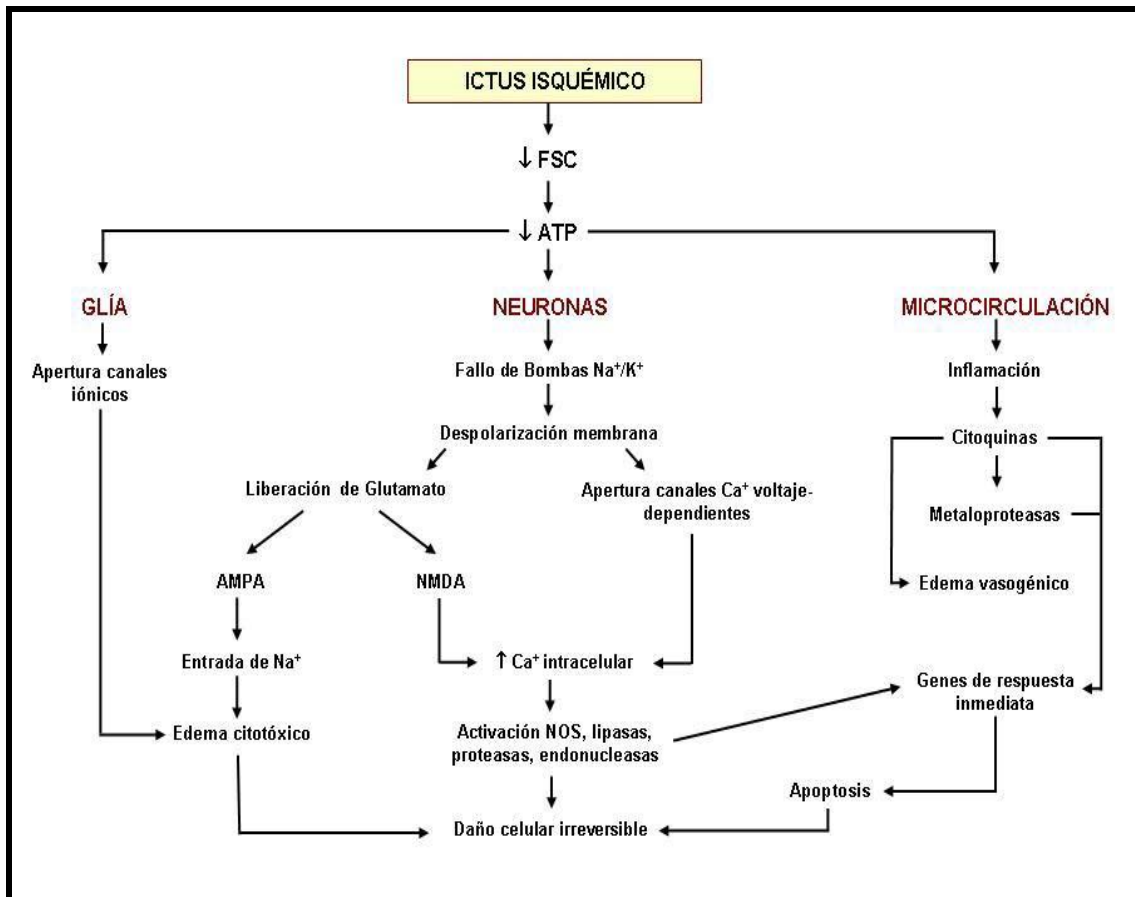


Figura 3: Principales eventos bioquímicos que suceden en la Isquemia Cerebral. Adaptado de Castillo et al., 2001.

1) LA CASCADA ISQUÉMICA NEURONAL

Como se ha citado antes, el déficit de ATP produce el fallo de la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa, lo que conduce a una disminución del K^+ intracelular, produciéndose la despolarización neuronal. Este hecho va a dar lugar principalmente a la apertura de los canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes y de otros tipos de canales de Ca^{2+} , lo que ocasiona un aumento de la concentración intracelular de este catión de, aproximadamente, el doble de su valor inicial, contribuyendo todavía más a la despolarización de la membrana (Pulsinelli, 1992; Heiss y Graf, 1994). Esta intensa despolarización de la membrana neuronal va a causar un aumento de la liberación de cantidades excesivas de glutamato y de otros aminoácidos excitadores (Choi y Rothman, 1990). El ácido glutámico va a actuar sobre sus receptores ionotrópicos (NMDA y AMPA) que se describirán más adelante, produciendo un aumento mayor de la despolarización de membrana y un aumento mayor de la concentración de calcio intracelular

(Choi, 1988). Estos efectos deletéreos ocasionados por el glutamato se conocen con el nombre de excitotoxicidad, que también será descrita con más detalle más adelante.

El aumento de Ca^{2+} es un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible. Este catión va a activar una serie de proteínas como son proteínquinasas, proteasas, endonucleasas, proteínfosfatasas y las sintasas de óxido nítrico (NOS) dependientes de calcio (Castillo, 1999). También va a condicionar la expresión de varios genes de respuesta inmediata.

Otros mediadores de daño celular importantes en la isquemia cerebral son las especies reactivas de oxígeno (EROS) y nitrógeno (ERNS). La producción de estas especies reactivas durante la isquemia excede la capacidad antioxidante de la neurona y de los astrocitos, y ocasiona alteraciones de algunos componentes celulares como son proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno responsables del estrés oxidativo neuronal son (para revisión ver (Dawson y Dawson, 1996):

- El anión superóxido (O_2^-), que se genera a partir de diferentes vías metabólicas y es el que inicia la cascada del estrés oxidativo en la isquemia cerebral.
- El radical hidroxilo (OH^\cdot)
- El peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que se forma mediante la acción de la superóxido dismutasa, que transforma el O_2^- en este radical y presenta la característica de que tiene fácil difusión dentro de la célula donde se origina y puede difundir también hacia neuronas adyacentes.
- El óxido nítrico (NO), que es un gas inorgánico permeable, difusible y con gran capacidad reactiva (Moncada y Higgs, 1993). Este gas se sintetiza a partir de la L-arginina por la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS) y actúa, en situaciones normales, como un mensajero neuronal. Sin embargo, en situaciones patológicas, como es el caso de la isquemia cerebral, se origina una elevada producción de NO produciendo neurotoxicidad. También el NO, en determinadas

situaciones, puede ser neuroprotector, papel que será analizado más adelante.

- El peroxinitrito (ONOO^-), cuya formación se produce cuando el NO reacciona con el O_2^- . El peroxinitrito es el responsable directo de la lisis neuronal al reaccionar con radicales sulfhidrilo, grupos tiólicos, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Zhang et al., 1994).

Además del glutamato, durante la isquemia cerebral, se liberan en grandes cantidades al espacio extracelular otros neurotransmisores, principalmente glicina y ácido γ -aminobutírico (GABA). La glicina es un co-activador necesario del receptor NMDA de glutamato y su excesiva liberación durante esta patología origina un aumento de la estimulación del receptor y un mayor daño neuronal (Castillo et al., 1996).

El GABA es un neurotransmisor inhibitorio, que se sintetiza a partir del glutamato por la acción de la descarboxilasa del ácido glutámico (GAD), y es degradado por la GABA-transaminasa (GABA-T). Durante la isquemia cerebral se produce un aumento de la síntesis de GABA, favorecido por el aumento en la concentración de glutamato, el aumento de la actividad de la enzima que lo sintetiza y de la inhibición de la enzima que lo degrada. La despolarización de la membrana neuronal originada por la isquemia conduce a la liberación masiva de GABA, el cual va a ejercer efectos inhibitorios (antagoniza los efectos del glutamato) mediante la unión a sus receptores GABA_A y GABA_B .

En el *core*, las neuronas mueren fundamentalmente por necrosis, que resulta del fracaso energético agudo, con pérdida de la morfología celular y, finalmente, lisis con desencadenamiento de procesos inflamatorios.

En la penumbra, en cambio, las neuronas mueren principalmente por apoptosis. La lesión del ADN por la acción de las endonucleasas y de las EROS pone en marcha un mecanismo autodestructivo, que implica alteración de la expresión génica. La mitocondria tiene un papel importante en la puesta en marcha de los mecanismos apoptóticos ya que, cuando se producen reducciones moderadas del ATP mitocondrial, se origina la liberación de caspasas, citocromo c y de otros factores al citoplasma, que contribuyen a la puesta en marcha del proceso apoptótico en la neurona. Como se indicó al comienzo de este apartado, la penumbra isquémica puede progresar a infarto

si no se controla correctamente. Esto se debe a fenómenos tardíos de muerte celular programada, así como a cambios en las propiedades de las neuronas, activación de la microglía y reacción inflamatoria (para revisión ver Castillo y Leira, 2001).

2) PAPEL DE LA GLÍA EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Aunque casi toda la atención del proceso isquémico se centra en las neuronas, es bien conocido que la isquemia cerebral produce la activación de la glía, no solo en el *core* y en la penumbra isquémicos, sino también en lugares alejados del foco isquémico (Schiffer et al., 1986). Las células de la glía en el sistema nervioso central se pueden dividir en: macroglía (astrocitos y oligodendrocitos) y microglía (macrófagos residentes del sistema nervioso central; Nedergaard y Dirnagl, 2005). En la activación de la glía, denominado también gliosis o reacción glial, se producen cambios estructurales y fisiológicos de los astrocitos y la microglía como respuesta a lesiones traumáticas, isquémicas o infecciosas en el sistema nervioso.

Los astrocitos son las células gliales más abundantes en el sistema nervioso central (Tower y Young, 1973) y desempeñan un papel fundamental en el ictus, tanto en el establecimiento de la lesión definitiva, como en la reparación tisular (Ransom y Sontheimer, 1992). En situaciones fisiológicas, estas células desarrollan múltiples funciones esenciales para el funcionamiento normal de las neuronas, como son la recaptación de glutamato, tamponamiento de K^+ y H^+ y el transporte de agua. En cambio, durante la isquemia cerebral, uno de los primeros cambios que se observan es el edema de los astrocitos. Este edema está condicionado por el fallo energético, la consiguiente despolarización de la membrana y la apertura de varios canales iónicos, dependientes o no del glutamato, con la consiguiente entrada de Na^+ y agua (Schneider et al., 1992). La recaptación de glutamato por los astrocitos se ve ralentizada o incluso reprimida por causa de este edema astrocítico, de la acidosis y las alteraciones iónicas que se producen durante la isquemia (Chen y Swanson, 2003). A nivel inflamatorio, en la isquemia los astrocitos poseen un papel importante, ya que liberan algunas citoquinas como $TNF-\alpha$, IL-1, 6 y 10, $IFN-\alpha$ y β . Esto tiene como consecuencia efectos como desmielinización,

infiltración leucocitaria y ruptura de la barrera hematoencefálica (Feuerstein et al., 1998).

La microglía, en colaboración con los astrocitos, también contribuye al daño tisular isquémico a través de varios mecanismos como, por ejemplo, la producción y liberación de citoquinas, NO, y otros radicales libres. Todos estos mediadores van a ayudar a propagar y mantener la neuroinflamación por múltiples mecanismos (Farooqui et al., 2007).

Los oligodendrocitos son otro tipo de células dentro de la glía, y se ha demostrado que no son especialmente sensibles al daño por mecanismos de excitotoxicidad (Castillo et al., 1997b).

Por último, es importante decir que una vez instaurada la lesión isquémica, tanto la astroglia como la microglía van a tener un papel muy importante en la reparación tisular.

3) ALTERACIONES DE LA MICROCIRCULACIÓN EN LA ISQUEMIA CEREBRAL

Durante la isquemia cerebral se producen una serie de alteraciones metabólicas y morfológicas en la microcirculación que van a tener un papel importante en el daño producido en esta patología. Se han descrito cinco respuestas diferentes de la microcirculación después de la isquemia cerebral: 1) pérdida del control sobre permeabilidad de las células endoteliales (alteración de la barrera hematoencefálica) con la producción del correspondiente edema vascular; 2) pérdida de la lámina basal vascular y de la matriz extracelular, con la consecuente transformación hemorrágica; 3) alteraciones en la adhesión célula endotelial – matriz extracelular; 4) pérdida de la luz microvascular y 5) expresión de moléculas de adhesión, produciendo infiltración de células polimorfonucleares dentro del parénquima cerebral (para revisión ver Hamman y del Zoppo, 2004).

Como el resto de las células cerebrales, las células endoteliales también sufren los efectos de la disminución de oxígeno y glucosa como consecuencia de la oclusión de un vaso en la isquemia cerebral. Esto trae consigo la pérdida del control iónico transmembrana, y se produce el edema vascular por la excesiva salida de K^+ y entrada de Na^+ y agua. El edema vascular tiene un

papel importante en la oclusión de la luz de algunos vasos, contribuyendo de esta manera al fenómeno del “no reflujo” (Ames et al., 1968). Se conocen también algunos mediadores que intervienen en esta pérdida de la barrera hematoencefálica y de la matriz extracelular, como son la bradiquinina (Kamiya et al., 1993), el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; Abumiya et al., 1999; Zhang et al., 2000), la trombina (Okada et al., 1994); (Aschner et al., 1997), determinadas metaloproteasas (MMPs; (Heo et al., 1999) y la acción de otras proteasas.

En cuanto a la pérdida de la lámina basal y de la matriz extracelular que rodea a la microcirculación tras la isquemia cerebral, se puede explicar mediante dos fenómenos: a) proteólisis local y b) mediante cambios conformacionales que sufren determinadas proteínas que integran esta matriz. Dentro de las proteínas cuya expresión se ve modificada están algunas MMPs y activadores del plasminógeno (PAs). Se sabe por múltiples evidencias tanto en experimentos con animales como en análisis de pacientes humanos que tras un *ictus*, se produce un aumento en la expresión de la proforma de MMP-2 y MMP-9, del activador de plasminógeno dependiente de uroquinasa (u-PA) y del inhibidor 1 del activador de plasminógeno (PAI-1) (Heo et al., 1999; Hosomi et al., 2001); Rosenberg et al., 1996; Rosenberg, 2002; Castellanos et al., 2003; Montaner, 2006). Estas proteínas, con actividad proteasa, son en parte responsables de la degradación de esta matriz extracelular. Se sabe también que el aumento de expresión de todas ellas, se debe en parte a las acciones de diferentes citoquinas como TNF- α o IL-1 β (para revisión ver Hamman y del Zoppo, 2004).

El aumento y liberación de estas dos citoquinas, TNF- α e IL-1 β , en el cerebro isquémico, va a producir una serie de respuestas en la microcirculación. Estas citoquinas son las primeras que se inducen e inician la respuesta inflamatoria (Hallenbeck et al., 2002), y estimulan la síntesis y liberación de otras citoquinas. Como resultado se produce en las células endoteliales un aumento en la expresión de MMPs y PAs que, como se ha citado antes, son responsables de la ruptura de la matriz extracelular y de la barrera hematoencefálica. También se induce en las células endoteliales la expresión de proteínas de adhesión (selectinas, adhesinas), que van a producir un aumento en la adhesión de leucitos circulantes a la pared de los vasos en la

zona isquémica. Estos leucocitos, debido a la ruptura de la barrera hematoencefálica, invaden el tejido dañado, en un intento de recuperarlo, continuando la inflamación que ya se había iniciado. Debido al elevado número de leucocitos, se producirá la oclusión de algunos vasos, contribuyendo de nuevo al fenómeno del “no reflujo”.

Por otro lado, en el endotelio vascular se producen especies reactivas con efectos vasoconstrictores, lo que va a contribuir a la reducción del calibre de determinados vasos. Estas especies reactivas, junto con el aumento de la permeabilidad vascular, etc., son otros factores responsables del daño cerebral mediado por la inflamación (para revisión ver Castillo et al., 2003).

A continuación se explicará con más detalle el daño que produce la excitotoxicidad por glutamato, los mecanismos inflamatorios más importantes en la isquemia cerebral y el papel de la inmunidad innata en la fisiopatología de esta enfermedad. Estos dos apartados recibirán una mención especial por tener un papel importante para el desarrollo de esta tesis doctoral.

1.1.5.1. Excitotoxicidad por Glutamato

1.1.5.1.1. Fisiología del glutamato en el sistema nervioso central.

El Ácido Glutámico es un aminoácido con carácter ácido y es uno de los más abundantes en el sistema nervioso central. Además es el neurotransmisor excitador más importante en este sistema en los mamíferos, en concreto su isómero levógiro, es decir, el L-glutámico, que es la forma activa fisiológicamente. Este neurotransmisor se encarga no sólo de la neurotransmisión sináptica rápida, sino que también interviene en múltiples procesos fisiológicos como son la adquisición de memoria, el aprendizaje, la plasticidad, además de la muerte neuronal (Ozawa et al., 1998). Este aminoácido se sintetiza en el citoplasma de las neuronas a partir de glutamina y se almacena en vesículas sinápticas gracias a la actividad de los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs), un sistema de recaptación que depende del gradiente electroquímico de protones. Cuando se desencadena el potencial de acción en la neurona presináptica, la membrana

se despolariza fusionándose estas vesículas con ella y liberando el glutamato que contienen al espacio sináptico. Allí, este neurotransmisor actuará sobre dos tipos de receptores en la neurona post-sináptica, ionotrópicos y metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos son aquellos que están acoplados a un canal iónico y se encargan de la transmisión excitatoria rápida. Existen tres tipos, que se han denominado en función de determinados agonistas exógenos que son selectivos para cada tipo de receptor, y que son:

- Receptores α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA), que producen la despolarización de la neurona postsináptica mediante la entrada de Na^+ y, más tarde en el tiempo, en neuronas destinadas a morir, intervienen en la entrada de Ca^{2+} . Además de encargarse de la transmisión excitatoria rápida, juegan un importante papel en el remodelado y plasticidad sináptica y en la muerte celular por excitotoxicidad.
- Receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), que al igual que los anteriores despolarizan la neurona postsináptica mediante la entrada de Na^+ y sobre todo de Ca^{2+} y juegan un papel muy importante en diferentes trastornos neurológicos y en enfermedades neurodegenerativas. Estos receptores, a diferencia de los AMPA, producen una transmisión excitatoria más lenta y se han considerado como los candidatos de mediar la entrada de Ca^{2+} en neuronas destinadas a morir.
- Receptores de kainato, que despolarizan la membrana postsináptica mediante la entrada de Na^+ . Aunque a estos receptores clásicamente se les ha prestado poca atención, parece que poseen algunas acciones importantes en algunas enfermedades neurodegenerativas. (para revisión ver Zukin et al., 2004).

Otro grupo de receptores de glutamato son los denominados receptores metabotrópicos o mGluR. Hasta la fecha, los diferentes tipos de receptores mGlu clonados, se han clasificado en tres subgrupos en función de su homología. Así podemos decir que los receptores mGlu del subgrupo I se caracterizan por estar acoplados a fosfolipasa C, mientras que los receptores de los subgrupos II y III están acoplados a proteínas G (para revisión ver

Pellegrini-Giampietro, 2003). En cuanto a su localización, se ha visto que se encuentran tanto en la pre-sinapsis o en la post-sinapsis en diferentes zonas del cerebro. Todos ellos se han implicado en la excitotoxicidad por glutamato que se produce en la isquemia cerebral, siendo el subgrupo I el que se ha asociado mucho más que el resto a la producción de daño, sobre todo a la muerte neuronal tras la isquemia (Bordi y Ugolini, 1999). De entre las acciones que estos receptores ejercen tras la isquemia cerebral podemos destacar: 1) el aumento de la excitabilidad neuronal causada por corrientes catiónicas intracelulares o por la reducción de la conductancia al K^+ ; 2) el aumento de Ca^{2+} intracelular proveniente de los sitios de almacenamiento interno y 3) un aumento de la liberación de glutamato debido a la acción de agonistas de los mGluR del subgrupo I (Pellegrini-Giampietro, 2003). Por el contrario, existen algunas evidencias experimentales sobre el papel neuroprotector de este subgrupo de receptores, aunque los mecanismos neurotóxicos/neuroprotectores de los mGlu del subgrupo I están actualmente bajo estudio (para revisión ver Nicoletti et al., 1999).

Para finalizar la acción excitatoria del glutamato y mantener su concentración extracelular por debajo de niveles excitotóxicos, existen unos transportadores dependientes de Na^+ y de alta afinidad para el glutamato, denominados transportadores de aminoácidos excitatorios (EAATs). Estos transportadores se encuentran en la membrana tanto de neuronas como de células de la glía y eliminan este neurotransmisor de la hendidura sináptica.

El glutamato circula entre las células y el espacio sináptico a través del ciclo glutamato-glutamina. Así, el glutamato recaptado por las células gliales se metaboliza para convertirse en glutamina, que será de nuevo transportada a las neuronas donde será transformada otra vez en glutamato y este a su vez será de nuevo empaquetado en las vesículas sinápticas por la acción de los VGLUTs. También se ha demostrado que el glutamato recaptado por neuronas postsinápticas GABAérgicas sirve como precursor para la síntesis de GABA (Figura 3 A; para revisión ver (Shigeri et al., 2004).

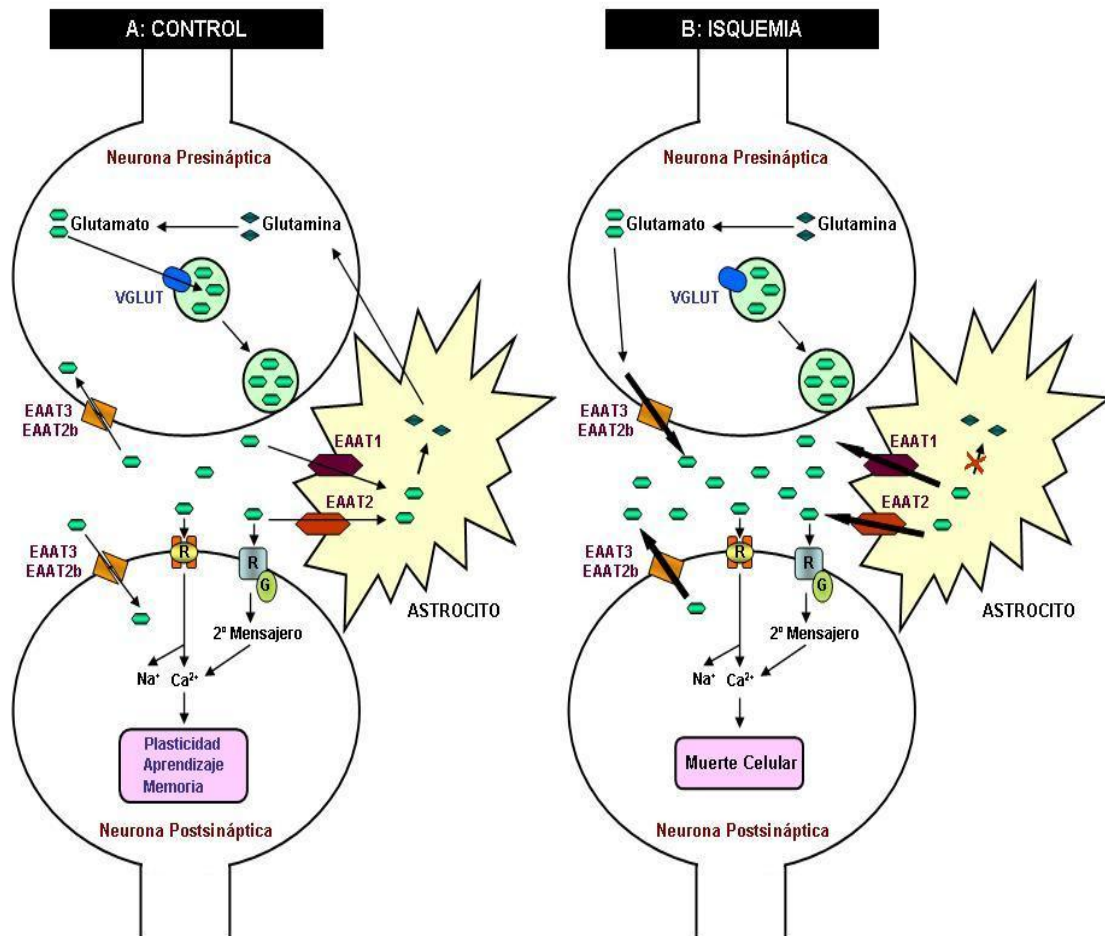


Figura 4: Esquema de una sinapsis glutamatergica en situación control (A) y en isquemia cerebral (B). Adaptado de (Allen et al., 2004).

1.1.5.1.2. Características del transporte de glutamato

Hasta el momento se ha descrito la existencia de dos familias de transportadores de glutamato, los transportadores de aminoácidos excitadores o **EAATs** y los transportadores vesiculares de glutamato o **VGLUTs**. En el apartado anterior hemos citado brevemente la función de estos últimos, y no serán tratados en detalle puesto que no intervienen en la modificación de la concentración extracelular de glutamato que se produce tras la isquemia cerebral.

De los transportadores de aminoácidos excitadores o EAATs se conocen cinco subtipos, codificados por cinco genes diferentes (para revisión ver Huang y Bergles, 2004). En humanos, a estos transportadores se les ha denominado

EAATs 1-5, mientras que en el resto de mamíferos la nomenclatura es diferente:

- GLAST (equivalente al EAAT1 humano; (Storck et al., 1992) está localizado principalmente en células de la glía (astrocitos) y es el transportador de glutamato que aparece durante el desarrollo del sistema nervioso central (Furuta et al., 1997a). En el adulto aparece en la glía del cerebelo y con menor expresión en el resto del cerebro y en la médula espinal.
- GLT-1 (equivalente a EAAT2 humano; (Pines et al., 1992) localizado en la astroglia y aparece expresado después del nacimiento. Es el responsable de la recaptación del 90% del glutamato en el tejido adulto (Tanaka et al., 1997). Este transportador presenta una variante de “splicing” con un extremo C-terminal más corto que se conoce con el nombre de GLT-1b o EAAT2b. Se encuentra no sólo en astrocitos sino también en neuronas (Chen et al., 2002).
- EAAC1 (equivalente a EAAT3 humano; Kanai y Hediger, 1992) es un transportador neuronal que presenta una alta expresión en membranas de neuronas postsinápticas.
- EAAT4, que presenta la misma nomenclatura en humanos y en el resto de animales, y cuya expresión esta limitada a las células de Purkinje del cerebelo (Fairman et al., 1995).
- EAAT5 que, al igual que el anterior, posee igual nomenclatura en humanos y animales y se expresa en células fotorreceptoras y bipolares de retina (Arriza et al., 1997).

Una vez conocidos los diferentes transportadores de glutamato, en los siguientes capítulos se utilizará la nomenclatura EAAT1-5.

Los distintos EAATs presentan una homología en su secuencia de aminoácidos que va desde el 40% al 60%. Actualmente no se conoce su estructura tridimensional, pero se han utilizado métodos indirectos basados en la hidrofobicidad de la secuencia de aminoácidos y en la accesibilidad de los residuos para predecir su estructura transmembrana. Se han propuesto dos modelos diferentes (figura 4; Seal y Amara, 1998; Grunewald y Kanner, 2000), que sugieren que estos transportadores presentan entre 6 y 8 dominios α -hélice transmembrana con bucles de reentrada y con los dominios N y C-

terminal situados en el citoplasma. Todos ellos presentan unos dominios ricos en serina que parecen ser los lugares de unión al sustrato, por analogía con otros receptores. Otros dominios conservados entre ellos son unas secuencias consenso para la fosforilación por las proteínas quinasas C y A (PKC y A), que parecen ser importantes para la eficacia del transporte del glutamato por parte del transportador. Por último presentan todos ellos secuencias consenso para la N-glucosilación (para revisión ver Gegelashvili y Schousboe, 1997).

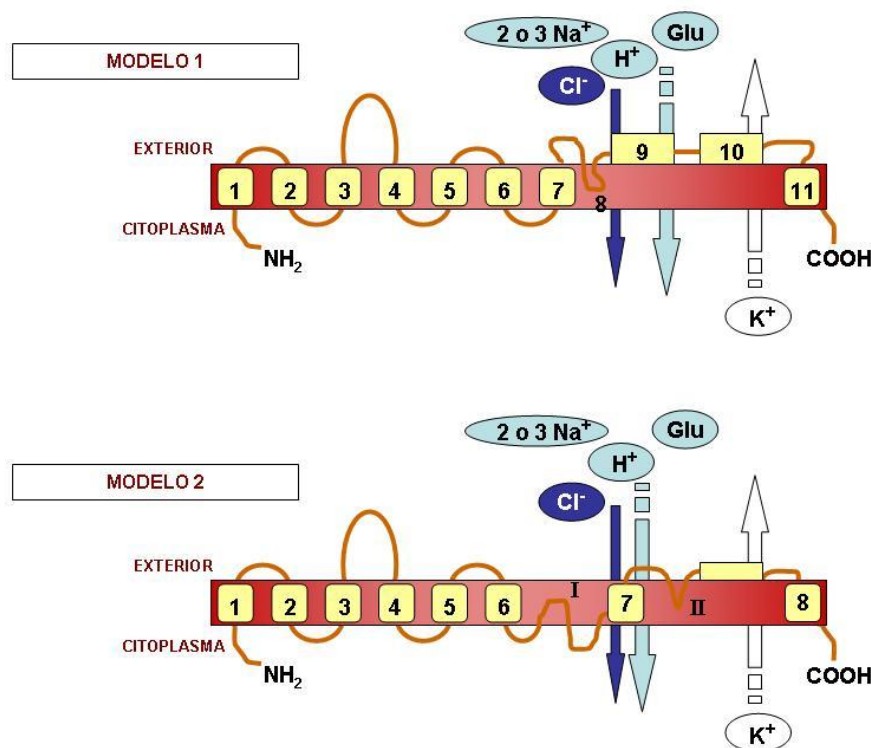


Figura 5: Estructura de los EAATs según Seal y Amara (Modelo 1) y según Grunewald y Kanner (Modelo 2). Figura adaptada de Shigeri et al., 2004.

Como se ha citado anteriormente, estos transportadores van a recaptar glutamato para, por un lado, evitar que este neurotransmisor alcance niveles tóxicos en el espacio extracelular y, por otro, poner fin a la transmisión glutamatérgica excitatoria. Este transporte es un proceso electrogénico en donde en cada ciclo y como aparece en la figura 4, una molécula de L-glutamato es recaptado junto con dos o tres iones Na^+ y un H^+ a la vez que sale un ion K^+ al exterior de la célula. Además de este transporte de glutamato e iones, se facilita la conductancia para el Cl^- , fenómeno muy activo en el

transporte ejecutado por EAAT4 y 5 (Bergles et al., 2002; Sheldon y Robinson, 2007). Por diversas técnicas se ha estimado que las concentraciones intracelulares de glutamato en las neuronas son de 5-20 mM y de 0.1-5 mM en las células gliales. En condiciones normales, se cree que las concentraciones extracelulares de glutamato oscilan entre 0.6 μ M y 10 μ M. Como vemos, gracias a los transportadores es posible conseguir gradientes de casi 4 órdenes de magnitud.

Existen varios niveles en cuanto a la regulación endógena de la expresión y actividad de los EAATs:

1) Regulación de la transcripción, procesamiento del ARN mensajero (ARNm) y de la traducción.

La información sobre los elementos que regulan la transcripción de los transportadores de glutamato es reducida. Se sabe que sus regiones promotoras presentan elementos bien definidos como son los elementos-cis (cajas TATA y CAAT) y presentan varias secuencias consenso para diferentes factores de transcripción como Sp1, Nf- κ B, AP2... (Su et al., 2003); Mallolas et al., 2006; Romera et al., 2007). Uno de los ejemplos de regulación de la expresión de estos transportadores se observa en algunos de los estudios realizados en nuestro grupo de trabajo. Por un lado se ha observado un polimorfismo existente en la población para el transportador EAAT2. Este polimorfismo afecta al promotor de esta proteína y provoca que un sitio de unión para la proteína activadora 2 (AP-2) desaparezca y se forme uno nuevo para el factor GCF2. Este cambio en el promotor del transportador EAAT2 se ha asociado con niveles elevados de glutamato y con un mayor deterioro neurológico en los pacientes que lo presentan, lo que nos indica la importancia de este transportador glial en la isquemia cerebral (Mallolas et al., 2006). En otro trabajo también realizado en nuestro grupo de trabajo, se ha observado que la expresión de EAAT2 después del preconditionamiento isquémico cerebral es PPAR- γ dependiente y tiene un papel importante en la neuroprotección tras la isquemia experimental (Romera et al., 2007).

Poco se conoce sobre los factores que regulan el procesamiento de los ARNm de estos transportadores, aunque se han visto diferentes ARNm para EAAT2 y 3, lo que indica que estos ARNm sufren “splicing” alternativo. Por último, y dentro de este apartado, se ha visto en diferentes situaciones que los niveles de mensajero no se corresponden con los niveles de proteína y viceversa, lo que indica que se produce una regulación a nivel de la traducción (para revisión ver Gegelashvili y Schousboe, 1997).

2) Regulación post-traducciona

Se han descrito dos posibles modificaciones post-traduccionales para los transportadores de glutamato, fosforilación y glucosilación, que podrían tener papeles importantes en la regulación de los mismos en cerebro. Un ejemplo de fosforilación y su importancia en la regulación de la actividad de los transportadores, es la fosforilación de EAAT2 por PKC en astrocitos, que produce un aumento de la recaptación de glutamato cuando este transportador está fosforilado en este sitio (Casado et al., 1993).

En cuanto a la Glucosilación, se ha demostrado que la N-glucosilación de EAAT3 parece ser esencial para su inserción en la membrana y su correcta actividad (Ferrer-Martinez et al., 1995; Yang y Kilberg, 2002).

3) Otros factores reguladores:

- Se ha propuesto que algunas sustancias secretadas por las neuronas como, por ejemplo, el propio glutamato, podrían estimular la recaptación en astrocitos a través de la modulación de la cantidad de transportadores, así como inducir modificaciones bioquímicas sobre los transportadores existentes. Este fenómeno se ha demostrado en la isquemia cerebral, donde la excesiva liberación de glutamato produce un aumento en la expresión de EAAT2 (Anderson and Sandler, 1993; Hurtado et al., 2008).

- La activación normal de los EAATs requiere la presencia de proteínas asociadas a los transportadores de glutamato (GTRAPs), que son proteínas endógenas que se localizan en la membrana y en el citoplasma de numerosas células del sistema nervioso central y regulan el tráfico de los EAATs dentro de la célula hacia la membrana (para revisión ver Maragakis y Rothstein, 2004). La traslocación a la membrana de los EAATs es un proceso clave en la regulación

funcional de estos transportadores, ya que es allí donde realizan su acción. También se ha demostrado que la asociación de los EAATs a determinados microdominios de la membrana plasmática, denominados balsas lipídicas o “Lipid-rafts” es muy importante para su movimiento hacia la membrana y su correcto funcionamiento (Butchbach et al., 2004; Hurtado et al., 2008).

- Determinadas aminos biogénicas que en el sistema nervioso actúan como neurotransmisores pueden afectar a la recaptación de glutamato. Este es el caso de la dopamina, que inhibe la actividad de los transportadores (Kerkerian et al., 1987).

- El ácido araquidónico, por su poder de modificación de las propiedades eléctricas y bioquímicas, parece que regula la efectividad de la recaptación de glutamato (para revisión ver Amara y Fontana, 2002)

- También se ha demostrado que el NO inhibe la recaptación de glutamato por sus transportadores debido a su capacidad oxidante, ya que modifica determinados residuos de estos EAATs disminuyendo su eficacia en el transporte y, por otro lado, desestabilizando las membranas, lo que disminuye la presencia de estos transportadores en la superficie celular (para revisión ver Gegelashvili y Schousboe, 1997).

4) Otros factores que también influyen sobre la recaptación de glutamato por los EAATs son factores termodinámicos indirectos como, por ejemplo, los gradientes iónicos y los potenciales de membrana (para revisión ver Anderson y Swanson, 2000).

Por último, también existiría una regulación a nivel experimental de estos transportadores basada en el empleo de herramientas farmacológicas como son el empleo de oligodeoxinucleótidos antisentido, empleo de animales Knock-out o de determinados compuestos como, por ejemplo, CDP-colina, determinados antibióticos (β -lactámicos), agonistas PPAR- γ , etc., de los que se ha demostrado que tienen un efecto sobre estos EAATs (Shigeri et al., 2004; Hurtado et al., 2007a; Romera et al., 2007, Lipski et al., 2007; Chu et al., 2007).

1.1.5.1.3. Excitotoxicidad por glutamato en la isquemia cerebral

El conocimiento de que el glutamato es potencialmente tóxico para las células de estirpe neural se conoce desde los años 50, cuando Lucas y Newhouse observaron que la inyección de L-glutamato era capaz de destruir las capas internas de la retina de ratón (Lucas y Newhouse, 1957). Años más tarde, el grupo de Olney describió que la “retinotoxicidad” producida por el glutamato venía acompañada de hinchazón celular, que era más pronunciada cerca de los componentes dendrosomales, que son los que en la actualidad se sabe que expresan mayor cantidad de EAATs. En 1969, este investigador acuñó el término “excitotoxicidad” para referirse a la neurodegeneración mediada por glutamato y otros aminoácidos excitadores (Olney y Ho, 1970).

Cuando se produce un infarto isquémico, el primer evento que ocurre y que va a desencadenar todos los procesos fisiopatológicos del *ictus* es la disminución de los niveles de ATP. Como consecuencia de la falta de energía, todos los procesos encargados de mantener los gradientes iónicos de la membrana fallan, lo que produce una acumulación de Na^+ en el citoplasma y de K^+ en el exterior y la consecuente despolarización de la neurona. Esto causa un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , evento que iniciará la fusión de vesículas cargadas de glutamato con la membrana plasmática, liberando cantidades excesivas de este neurotransmisor al espacio sináptico (Choi, 1988; Choi y Rothman, 1990; Figura 3 B).

En realidad, esta excesiva liberación de glutamato no sólo se debe a la exocitosis de este neurotransmisor a causa de la despolarización de la membrana neuronal, sino que la reversión de los EAATs contribuye a este fenómeno de manera muy importante. Como vimos, el transporte de aminoácidos excitadores está acoplado al transporte de Na^+ , ión que en la isquemia cerebral se acumula en el interior de la célula, siendo en estas condiciones donde se cree que se produce la reversión de los transportadores de glutamato (Madl y Burgesser, 1993; Szatkowski y Attwell, 1994). Esta reversión se ha observado tanto en isquemia como en condiciones de despolarización anóxica en modelos de rebanadas de hipocampo (Rossi et al., 2000). Se piensa que la reversión de los transportadores sucede con más frecuencia o casi exclusivamente en neuronas y no astrocitos, ya que en las

neuronas se acumula mayor cantidad de glutamato en vesículas dentro del citoplasma (1mM en glía vs. 10 mM en neuronas). Además los astrocitos son menos sensibles a las condiciones de hipoxia y se ven menos afectados por los cambios en el potencial de membrana (para revisión ver Danbolt, 2001). Estas observaciones no implican que la liberación de glutamato que se produce tras isquemia provenga sólo de las neuronas, sino que también podrían estar implicados los astrocitos (para revisión ver Mennini et al., 2003). De hecho, algunos investigadores han encontrado evidencias que apuntan a que EAAT2 es uno de los transportadores que se revierte tras isquemia (Ogata et al., 1992; Seki et al., 1999; Phillis et al., 2000), aunque en este caso habría que tener en cuenta la posible aportación de su variante de “splicing” EAAT2b/GLT-1b, presente en neuronas. De todas maneras sobre este hecho existe una gran controversia, porque hay autores que afirman que el transporte glial no contribuye a la liberación de glutamato tras la isquemia, de hecho en estas condiciones el transporte glial de glutamato no funciona (Rossi et al., 2000).

Este exceso de glutamato activa sus receptores en la neurona postsináptica, lo que va a producir a su vez los siguientes eventos (ver figura 2):

- La activación de los receptores AMPA y de Kainato produce la entrada de Na^+ al interior de la célula, lo que conduce a la despolarización de la neurona postsináptica y a una mayor liberación de glutamato. (Tsubokawa et al., 1994). La entrada masiva de Na^+ debida sobre todo a la activación de los receptores AMPA se acompaña de la entrada de agua, lo que producirá edema celular. También se ha demostrado que la activación de estos receptores contribuye a la sensibilización de más receptores NMDA (Choi, 1988).

- La activación por glutamato sobre todo de los receptores NMDA y, en menor medida, de los AMPA, ocasiona una entrada masiva de Ca^{2+} y Na^+ , despolarizando la célula y activando la cascada isquémica Ca^{2+} -dependiente, que causará la muerte celular.

- También se activan los mGlu del glutamato los cuales, tal y como se ha explicado antes, producen la liberación de Ca^{2+} desde compartimentos celulares internos, contribuyendo al aumento todavía mayor de este catión (Choi, 1988).

Este aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} , tal y como se ha explicado antes, va a ser un factor clave en los procesos que conducen al daño neuronal irreversible (figura 4B). En concreto, es responsable de la activación de multitud de enzimas como son proteínquinasas, proteasas, endonucleasas, proteínfosfatasa, etc. Además, la activación de los receptores NMDA y la entrada de Ca^{2+} produce la activación de la sintasa de óxido nítrico neuronal (nNOS), que va a generar NO, radical libre que junto con la activación de todas las enzimas antes citadas, van a concluir con el daño celular irreversible que se produce durante y tras la isquemia cerebral. Otro fenómeno originado como consecuencia del aumento intracelular de Ca^{2+} es la expresión de varios genes de respuesta inmediata (Castillo, 1999).

La acumulación excesiva en el espacio extracelular de glutamato también produce toxicidad porque afecta al sistema de transporte cisteína-glutamato o sistema X_c^- (Murphy et al., 1990). Este sistema se encarga de transportar glutamato al exterior celular a cambio de cisteína, la cual constituye una fuente importante para la formación del sistema antioxidante más importante de la célula, el glutatión. Lewerenz y colaboradores han demostrado que un exceso del glutamato extracelular bloquea este sistema de transporte en células HT22, un tipo de línea celular de estirpe neuronal (Lewerenz et al., 2006).

Otro mecanismo que contribuye a la excitotoxicidad por glutamato es el aumento en la liberación de glicina en la isquemia cerebral. La glicina es un co-activador necesario del receptor NMDA y su excesiva liberación durante esta patología origina un aumento de la estimulación del receptor y un mayor daño neuronal (Castillo et al., 1996).

Por todas estas evidencias podemos inferir que la excitotoxicidad por glutamato es uno de los principales factores implicados en la muerte neuronal tras la isquemia cerebral. De hecho, un gran porcentaje de los fármacos que han resultado ser neuroprotectores en modelos animales lo son por interferir con el glutamato liberado tras la isquemia o por interferir en sus acciones. Este es el caso de fármacos que actúan de manera directa sobre receptores de glutamato en la neurona post-sináptica, como es el caso de los antagonistas de receptores NMDA como la dizocilpina (MK-801), el CS-19755 o el dextrorfanio (www.stroketrials.org) o de otros que actúan sobre otros participantes en la

cascada isquémica, cuya inhibición acaba traduciéndose en una disminución indirecta de la liberación de glutamato al medio extracelular, como se ha demostrado en trabajos de nuestro laboratorio con el 1400W (inhibidor de iNOS; Perez-Asensio et al., 2005), con antioxidantes como el glutatión o el tocoferol (Hurtado et al., 2003), con aspirina (De Cristobal et al., 2002) o con citicolina, que aumentan la asociación de EAAT2 a las balsas lipídicas de la membrana (Hurtado et al., 2008). Teóricamente, el control de la señalización por glutamato sería suficiente para conseguir efectos protectores en pacientes, bien inhibiendo la liberación como en el caso de los fármacos descritos, o bien bloqueando sus acciones postsinápticas. Sin embargo, los estudios clínicos que se han llevado a cabo utilizando antagonistas de los receptores de glutamato sólo han conseguido resultados negativos debido a la gran cantidad de efectos secundarios que poseen, en parte por su interferencia con la señalización glutamatérgica normal del cerebro (ensayos clínicos en www.stroketrials.org; para revisión ver Aarts y Tymianski, 2003).

1.1.5.2. La inflamación y la inmunidad en la isquemia cerebral

1.1.5.2.1. Neuroinflamación, como proceso para recuperar el tejido

En contra de lo que históricamente se afirmaba acerca de que el cerebro era uno de los órganos “privilegiados” de sistema inmune, actualmente se sabe que el cerebro es un órgano activo desde el punto de vista inmunológico. La respuesta inmune en el cerebro es un gran ejemplo de las conexiones que existen entre este órgano y el resto del cuerpo; de hecho, se ha demostrado que reacciones inflamatorias sistémicas pueden influir sobre la actividad cerebral (Wilson et al., 2002). Al igual que en el resto del organismo, la inflamación que se desencadena en el sistema nervioso central, también llamada neuroinflamación, es un mecanismo cuyo fin es proteger el órgano afectado, aislando la zona dañada, destruyendo las células afectadas y reparando la matriz extracelular (Correale y Villa, 2004). Pero en muchas de las patologías cerebrales, como es el *ictus*, la inflamación es una de las partes

implicadas en el daño producido en esta patología, daño que será descrito más adelante.

Se ha demostrado que todos los tipos celulares (neuronas, astrocitos, microglía y oligodendrocitos) participan en esta respuesta inflamatoria. Aun así, los principales mediadores en la neuroinflamación son las células de la microglía. Estas células, al reconocer diferentes compuestos derivados del daño celular o de patógenos, se activan, adquiriendo una morfología ameboide y cambiando su composición molecular superficial. Así, inician una respuesta rápida que incluye la migración y proliferación celular en torno al área dañada, liberan una serie de citoquinas con diferentes acciones, fagocitan las células muertas, tienen capacidad de presentar los antígenos a las células correspondientes y, en definitiva, contribuyen a la recuperación del tejido, aunque todos estos mecanismos están actualmente bajo estudio (Farooqui et al., 2007).

Esta respuesta inflamatoria, aparte de la activación de la microglía, requiere el reclutamiento de células polimorfonucleares (PMN) que provienen del torrente circulatorio. Este reclutamiento se debe a la liberación por parte del tejido nervioso y de los vasos cerebrales de citoquinas con carácter quimioatrayente y moléculas de adhesión. Estos PMN, en el tejido nervioso ayudarán a la eliminación de antígenos mediante la liberación de radicales libres, enzimas líticas y fagocitosis. A continuación se iniciará un proceso denominado resolución de la inflamación, en donde todas estas células rodean completamente el área afectada y liberan sustancias anti-inflamatorias (citoquinas fundamentalmente) y reparadoras, que pondrán fin al proceso inflamatorio, recuperando el tejido dañado y ayudando a drenar todos estos PMN hacia el sistema linfático (Serhan y Savill, 2005).

1.1.5.2.2. Daño por neuroinflamación en la isquemia cerebral

Cuando en un órgano se produce cualquier tipo de daño, se activa el proceso inflamatorio de forma rápida y bajo la experiencia del dolor. En cambio, en patologías crónicas o procesos agudos como es el caso de la isquemia cerebral, la inflamación se desarrolla por debajo del umbral del dolor y de forma lenta y duradera en el tiempo, lo que va a conducir al daño cerebral.

Se sabe que este proceso inflamatorio, en la isquemia cerebral, progresa durante días e incluso semanas después de haber tenido lugar el episodio isquémico, y que participa en el daño cerebral, y contribuye a que el enfermo presente un peor pronóstico y mayores déficits neurológicos. Esta respuesta inflamatoria, como vimos al comienzo de este apartado, está asociada tanto a la activación de la microglía y de los astrocitos como a la infiltración de PMN al territorio isquémico. De entre los mecanismos por los cuales esta inflamación contribuye al daño cerebral producido en la isquemia, podemos destacar (Figura 6):

1) Daño provocado por citoquinas y moléculas de adhesión.

Cuando se produce un episodio isquémico, las células de la glía se activan. En esta activación van a liberar una serie de citoquinas pro-inflamatorias como, por ejemplo, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β , moléculas que actuarán sobre todas las células del parénquima cerebral, así como en las células endoteliales. Nuestro grupo de trabajo ha demostrado, tanto en modelos experimentales como en pacientes, el aumento y la actuación de $\text{TNF-}\alpha$ en la isquemia cerebral (Hurtado et al., 2002; Castillo et al., 2003). Uno de los efectos que van a desencadenar estas citoquinas pro-inflamatorias es la inducción de la expresión de moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1), selectinas (E-selectina y P-selectina) e integrinas, tanto en células endoteliales como en PMN circulantes y en plaquetas (para revisión ver Barone y Feuerstein, 1999). Esto provoca la interacción de PMN circulantes con las células endoteliales de los vasos, produciendo su adhesión y su posterior migración al parénquima cerebral (del Zoppo et al., 2000). Ambos tipos celulares, PMN y microglía, liberan EROS y contribuyen a la oclusión de la microcirculación (fenómeno de no-reflujo, que consiste en la oclusión de microvasos debido a la alta densidad de PMN circulantes concentrados en ellos), eventos que van a agravar el daño por la isquemia (para revisión ver Lipton, 1999; Emerich et al., 2002).

Existen además evidencias experimentales en las que se ha demostrado que la liberación de citoquinas como $\text{TNF-}\alpha$ o IL-1 β contribuye directamente al daño producido tras la isquemia cerebral, mediante la inducción de enzimas

pro-inflamatorias tales como iNOS, COX-2 o metaloproteasas de matriz (MMPs) (para revisión ver Iadecola, 2004).

2) Papel del NO y de la sintasa inducible de NO (iNOS)

Como se ha explicado, el NO es un efector crítico en el daño producido tras la isquemia cerebral. Este radical libre, en condiciones normales, actúa como una molécula señalizadora en la transmisión sináptica pero, en condiciones patológicas, actúa como una neurotoxina. Existen tres isoformas de NO-sintasas (NOS): neuronal (NOS-1 o nNOS), inducible (NOS-2 o iNOS) y la forma endotelial (NOS-3 o eNOS). Tanto la neuronal como la endotelial son formas constitutivas, cuya actividad es dependiente de Ca^{2+} , mientras que la forma inducible o iNOS es independiente de este catión. El NO va a tener diferentes acciones dentro de la fisiopatología del *ictus*, dependiendo de la NOS que intervenga. El aumento de la producción de NO mediado por la nNOS origina una lesión neuronal inmediata, y su activación es una de las consecuencias de la excitotoxicidad por glutamato. En cambio, el NO producido por la iNOS contribuye al daño neuronal retardado inducido por la inflamación. Los mecanismos por los cuales el NO y sus derivados (fundamentalmente el ONOO^-) ejercen sus efectos nocivos son diversos, incluyendo desde la inhibición de las enzimas que sintetizan ATP, daño del ADN, y daños por oxidación en diferentes componentes de la membrana (Zhang et al., 1994). Sin embargo, la producción de NO mediada por la eNOS actúa como neuroprotectora, induciendo la relajación de la fibra muscular lisa y ayudando al mantenimiento del FSC regional (Samdani et al., 1997).

Existen múltiples evidencias, tanto experimentales como en pacientes, en las que se ha observado un aumento temprano en la expresión del ARNm de iNOS (12-48 horas) tras la isquemia (Iadecola et al., 1995; Grandati et al., 1997). También se ha demostrado que esta isoforma está fuertemente expresada en los PMN infiltrados y en los vasos sanguíneos dentro del territorio isquémico. Por otro lado, en experimentos en los que la iNOS es inhibida por diferentes compuestos 6 o 24 horas después de la isquemia experimental, se ha demostrado que se reduce el volumen de infarto, lo que explica la relevancia de la actividad de esta enzima en la fisiopatología de la isquemia cerebral (para revisión ver Iadecola, 2004). Sin embargo, como veremos más adelante, en

determinadas situaciones el NO producido por iNOS puede tener un papel neuroprotector.

3) Daño producido por la Ciclooxygenasa-2 (COX-2)

La ciclooxygenasa es una proteína integral de membrana, encargada de la síntesis enzimática de prostaglandinas y tromboxanos a partir del ácido araquidónico. Hasta el momento, se han descrito dos isoformas: la forma constitutiva o COX-1, expresada por todo tipo de células y encargada de la producción fisiológica de las sustancias antes citadas (Vane y Botting, 1998), y la forma inducible o COX-2 expresada rápidamente por la acción de mitógenos, mediadores inflamatorios y hormonas (O'Banion, 1999). En los últimos años algunos autores consideran que existe una tercera isoforma, COX3. Otros, en cambio, piensan que es una variante de splicing de COX-1 que se expresa principalmente en corazón y en cerebro (para revisión ver (Berenbaum, 2004), existiendo una gran controversia entorno a este tema.

La actividad catalítica de COX-1 y COX-2 está asociada a la producción prostanoïdes y radicales libres, aunque es esta última la que parece tener un papel más importante en el daño producido tras un *ictus* (Candelario-Jalil et al., 2003). Uno de los radicales libres que genera es el radical superóxido que, como hemos descrito antes, puede reaccionar con el NO, formándose ONOO⁻, que es el que producirá daño celular. Por tanto, la actividad de COX-2 en células inflamatorias y en neuronas durante un proceso inflamatorio agudo o crónico, contribuye al daño celular a través de la formación excesiva de EROS, ERNS y diferentes prostanoïdes.

Existen muchas evidencias experimentales que demuestran la participación de COX-2 en la progresión del daño cerebral producido por la isquemia. En primer lugar, el mensajero y la propia proteína (COX-2) aparecen pocas horas después de la isquemia y se ha observado su presencia en neuronas de la periferia del infarto, en células vasculares y en microglía en cerebro de roedores e incluso en cerebro humano. Al igual que para iNOS, la administración de inhibidores de COX-2 produce la disminución del volumen de infarto en modelos de isquemia cerebral en roedores, lo que indica que la actividad de COX-2 es importante en la fisiopatología de la isquemia cerebral (para revisión ver Iadecola, 2004).

4) Factores de transcripción implicados en la inflamación post-isquémica

La expresión de genes implicados en la respuesta inflamatoria esta controlada a nivel transcripcional y post-traducciona. A nivel transcripcional, algunos factores como el factor nuclear Kappa B (NF- κ B), el factor regulador de interferon 1 (IRF-1), AP-1 o los receptores activados por proliferadores de peroxisomas (PPARs) se han implicado en el contexto del control de la inflamación post-isquémica.

Estos factores de transcripción se activan como respuesta a diferentes señales pro-inflamatorias, tras lo cual migran al núcleo celular donde ejercen su acción. Existen múltiples evidencias experimentales sobre la acción de estos factores, en concreto sobre la regulación de la transcripción de genes proinflamatorios tales como iNOS, COX-2, MMPs, etc (para revisión ver ladecola, 2004). Como vemos, estos factores de transcripción regulan la expresión de otras proteínas, cuyo papel es muy importante en el daño inflamatorio producido tras la isquemia cerebral.

De todas formas y como veremos en los siguientes capítulos, muchos de estos mediadores que intervienen en el daño producido en la isquemia cerebral presentan acciones muy distintas a las descritas dentro de un escenario neuroprotector, como es el preconditionamiento isquémico cerebral. Estas acciones serán descritas en detalle a continuación, por ser el tema principal de esta tesis doctoral.

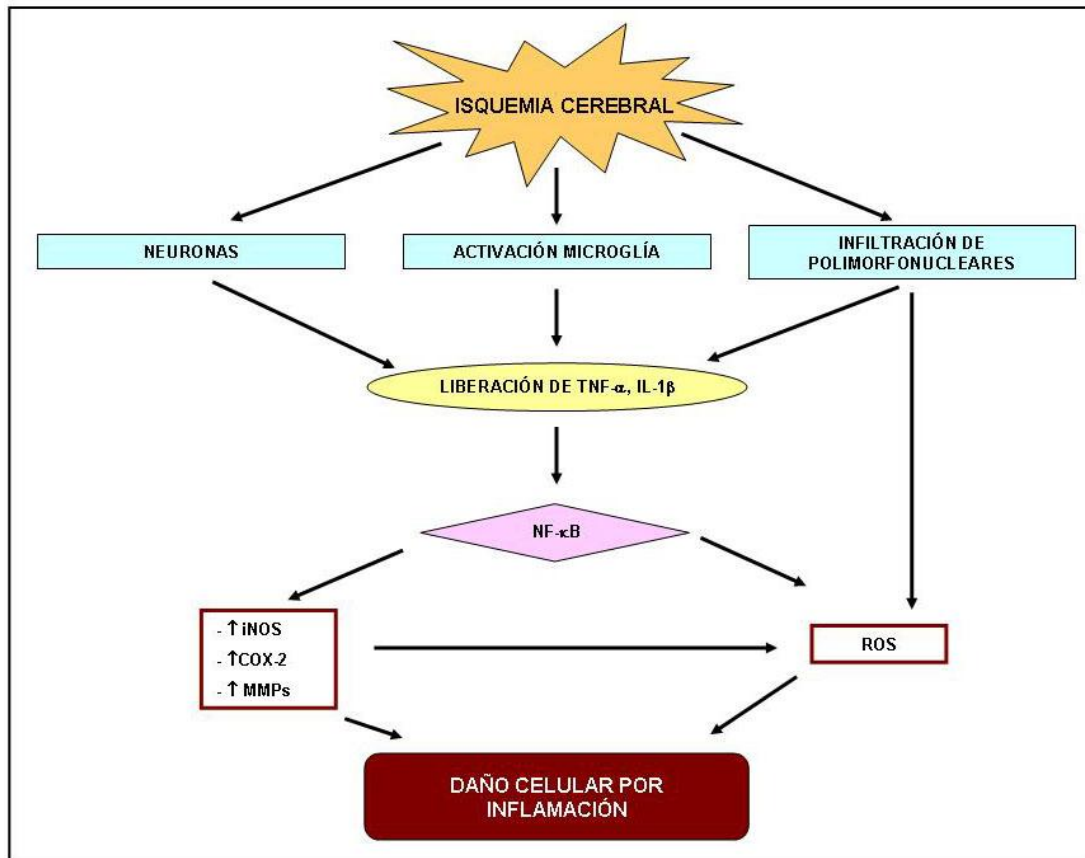


Figura 6: Mecanismos inflamatorios activados tras la isquemia cerebral.

1.1.5.2.3. Papel de la inmunidad innata en la isquemia cerebral.

Como se ha citado al comienzo de este apartado, desde siempre se ha considerado al cerebro como un órgano incapaz de generar una respuesta inmune. Por el contrario se ha demostrado recientemente que es un órgano capaz de responder con una reacción inmune de tipo innata no sólo ante una infección bacteriana sistémica sino también ante cualquier daño cerebral, llegándose a decir que la “inmunidad innata es el puente entre la neuroprotección y la neurotoxicidad en el SNC” (Nguyen et al., 2002). Esta respuesta inmune se genera en zonas específicas del SNC, los órganos circunventriculares, que son áreas con una vascularización más permeable que en el resto del tejido cerebral, donde se permite el paso de moléculas de mayor tamaño, como pueden ser anticuerpos. Así, una vez activadas las células de la microglía que residen en estas zonas, la respuesta se va extendiendo por todo el parénquima cerebral.

El sistema inmune innato necesita, para ponerse en marcha, una serie de receptores que detecten agentes de origen exógeno (procedentes de las infecciones de patógenos) o endógenos (procedentes del daño celular), siendo la primera línea de defensa del huésped. Estos receptores se han descubierto recientemente y se denominan receptores “Toll-like” (TLRs). En cuanto a la historia de este descubrimiento, en los años 80, se describió la proteína Toll, que participaba en el desarrollo dorsoventral y en la defensa de *Drosophila melanogaster* (Hashimoto et al., 1988). El término Toll fue utilizado por Nusslein-Volhard debido a que las moscas que carecían de esta proteína se desarrollaban con una morfología extraña, fantástica, que es lo que significa “toll” en alemán (Anderson et al., 1985). Tras descubrir varios homólogos de Toll en diferentes especies, en 1997 se identificó el primer homólogo humano, denominándose receptor Toll-like (Medzhitov et al., 1997). Actualmente se conocen más de 10 TLRs en el hombre; en general los TLRs son proteínas muy conservadas evolutivamente, siendo los receptores TLR2 y 4 los más conocidos en cuanto a sus ligandos y las vías de señalización que se ponen en marcha tras su activación. Dentro del SNC se ha observado la expresión de todos TLRs conocidos, detectándose su expresión principalmente en las células cerebrales con carácter inmune, la microglía, que expresa todos ellos y la astrogliá que expresa únicamente TLR2, 3 y 4 (Aravalli et al., 2007; Bottcher et al., 2003; Bsibsi et al., 2002).

Los TLRs son proteínas transmembrana tipo I, con un dominio extracelular rico en leucina (LRR), común a proteínas cuya función es el reconocimiento de ligandos, y un dominio intracelular común al del receptor de interleuquina (IL)-1, que se denomina por este motivo como dominio TIR (Toll/IL-1R), implicado en interacciones proteína-proteína.

Como se ha indicado antes, los TLRs van a detectar la presencia de agentes exógenos (infecciosos) o endógenos (procedentes del daño celular) para poner en marcha la respuesta inmune. Con este fin, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs; Medzhitov, 2001; Lee y Lee, 2002; Akira and Takeda, 2004) como, por ejemplo, lipopolisacárido (LPS) de bacterias gram negativas, peptidoglicano de gram positivas, la flagelina, secuencias de ADN microbiano, etc. También se han descrito otros ligandos endógenos o derivados del daño celular (DAMPs) como son las proteínas de

choque térmico (HSP), la fibronectina, ácidos grasos insaturados, ARNs y ADNs celulares, etc...; de hecho, se habla de que estas proteínas son “señales endógenas de peligro”, que aparecen después del daño celular (Lee y Lee, 2002). Los TLRs son capaces también de formar complejos multiméricos para aumentar así el patrón de moléculas que reconocen. Una vez activados por sus ligandos, van a activar diferentes vías de señalización, siendo las más conocidas las activadas por TLR2 y 4. En el caso de TLR4, por la unión de sus ligandos al este receptor activa vías de señalización mediadas por MyD88 (proteína adaptadora que contiene un dominio TIR C-terminal y un dominio de muerte N-terminal). A través de este dominio de muerte, MyD88 interactúa con dos serín-treonin-quinasas, denominadas IRAKs (quinasa asociada a IL-1R). Estas quinasas a su vez activan a TRAF6 (factor 6 activador del receptor TNF), que finalmente activa NF- κ B y quinasas activadas por mitógenos (MAP-quinasas; Nguyen et al., 2002; Lee and Lee, 2002; Akira y Takeda, 2004). También existen otras vías de señalización independientes de MyD88 que activarán otras vías de señalización y producirán distintos efectos como, por ejemplo, fiebre, establecimiento de la memoria, expresión otros mediadores inflamatorios, etc... (O'Neill, 2004; Akira y Takeda, 2004; figura 7).

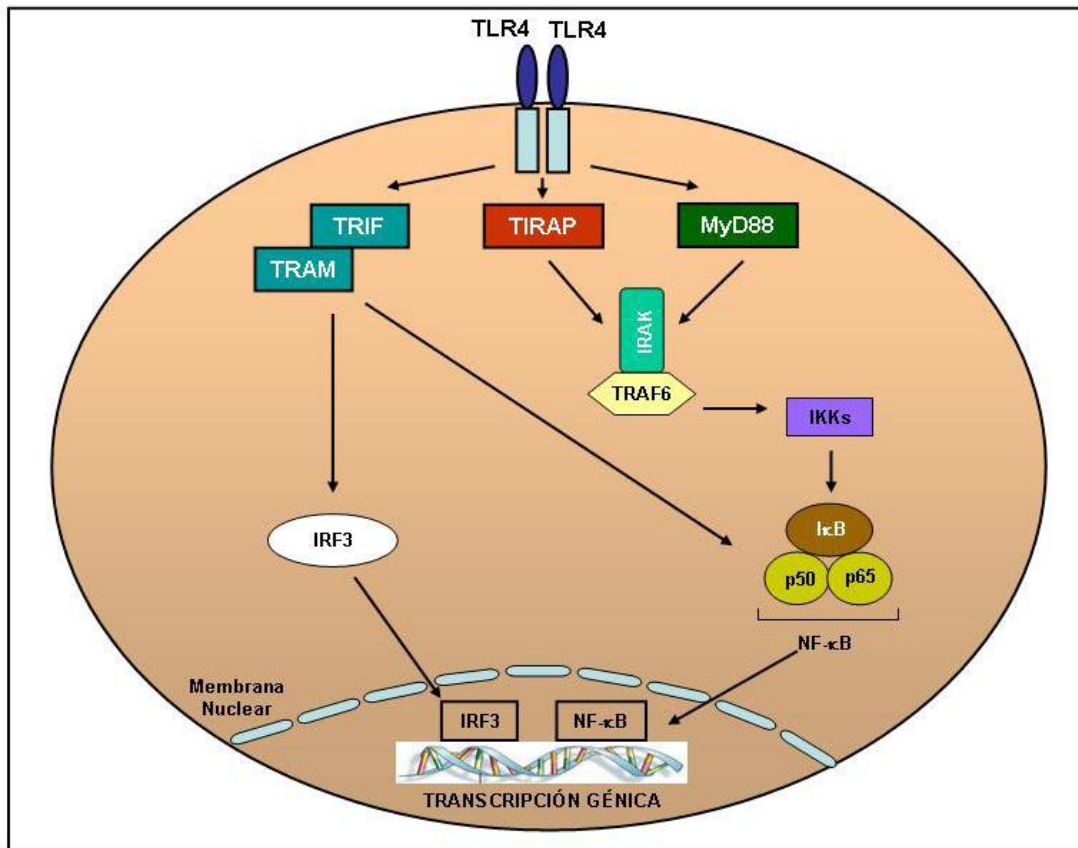


Figura 7: Vías de señalización activadas por TLR4. Modificado de Akira y Takeda, 2004.

Como se ha citado antes, existe mucha bibliografía que describe la implicación de NF- κ B en la fisiopatología de la isquemia cerebral. La activación de este factor de transcripción va a producir la liberación de citoquinas proinflamatorias (TNF- α), va a inducir la expresión de enzimas como iNOS, COX-2, MMP9, etc..., todos ellos factores inflamatorios que van a contribuir en el daño producido tras esta patología. Por tanto, y debido al tipo de señalización que se inicia tras la activación de los TLRs, se pensó que podían tener un papel importante en la fisiopatología de esta enfermedad. Existen pocos trabajos al respecto, estando uno de ellos realizado en nuestro laboratorio (Caso et al., 2007; Cao et al., 2007; Tang et al., 2007; Hua et al., 2007). En estos trabajos a parte de estudiar el papel de diferentes TLRs, se ha demostrado que TLR4 participa en la producción de mediadores inflamatorios y su participación en el daño tras la isquemia cerebral. Además, se ha descrito un polimorfismo en la población china para este TLR4 que hace que los pacientes que lo poseen presenten mayor riesgo de isquemia (Lin et al., 2005).

Por último y, como se aprecia por estos trabajos, aunque queda mucho por investigar en este campo, el sistema inmune innato, a través del receptor TLR4 participa del daño producido en el *ictus* isquémico.

1.2. PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO Y TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRALES

1.2.1. Historia y definición

Los fenómenos de preconditionamiento y tolerancia se conocen desde muy antiguo. Estos fenómenos se han denominado y definido de diferentes formas: por ejemplo, Hipócrates afirmaba que “*similla similibus curentur*”, es decir, lo similar cura lo similar; Paracelso utilizó la expresión “la dosis hace al veneno”, y Cannon resumió lo que ocurre en estos fenómenos con la expresión “la adaptación a las perturbaciones es la base de la homeostasis”. Esta respuesta celular se ha observado en casi todas las especies, lo que indica que es una función esencial de supervivencia celular frente a situaciones adversas (para revisión ver Feder y Hofmann, 1999). No fue hasta el año 1964 cuando Janoff introdujo los términos de “tolerancia” y “precondicionamiento” (Janoff, 1964), siendo en ese mismo año cuando estos fenómenos se observaron en relación con la isquemia. Así, se definió como: **fenómeno mediante el cual, breves períodos de isquemia (precondicionamiento isquémico o PI) aplicados sobre un tejido determinado ponen en marcha una serie de mecanismos que producen protección (tolerancia isquémica o TI) frente a un período isquémico más grave, de mayor duración y próxima en el tiempo**. Si bien existen observaciones sobre tolerancia isquémica se desarrolladas en los años 80 en corazón por el grupo de Murry (Murry et al., 1986), las primeras observaciones sobre este tema se realizaron en tejido cerebral en los años 60. Dahl y sus colaboradores demostraron que períodos cortos de hipoxia global eran capaces de proteger al organismo completo de un mamífero y preservar el metabolismo y la energía cerebral ante períodos de hipoxia posteriores y más largos (Dahl y Balfour, 1964).

Estos experimentos a nivel cerebral quedaron en el olvido, hasta, como se ha indicado antes, el grupo de Murry observó el fenómeno de tolerancia isquémica en corazón. Fue entonces cuando se pensó que las neuronas, al igual que el resto de las células del organismo, poseen la misma información genética, siendo lógico pensar que también pueden adquirir tolerancia frente a un estímulo estresante previo. De hecho, los primeros experimentos en células

de origen neural se desarrollaron en 1988, donde se demostró que períodos cortos de exposición a altas temperaturas producían mayor resistencia en células fotorreceptoras de retina a exposiciones de alta intensidad lumínica posteriores (Barbe et al., 1988). Más tarde, en 1990, Kitagawa y colaboradores fueron los primeros en describir que períodos cortos y no letales de isquemia en neuronas de hipocampo conferían tolerancia frente a un período isquémico posterior y más prolongado (Kitagawa et al., 1990). A partir de entonces, se han desarrollado muchos estudios que han demostrado el fenómeno de TI en diferentes modelos de isquemia cerebral. También se ha estudiado este fenómeno en diferentes órganos como, se ha mencionado antes, en el corazón, donde se ha alcanzado un alto nivel de conocimiento sobre los mecanismos implicados en la TI, que ha permitido a su vez el avance en las investigaciones en cerebro.

Para mejorar el conocimiento sobre los mecanismos que producen TI, se han realizado investigaciones muy interesantes en diferentes especies del reino animal, como es el caso de las especies hibernantes (para revisión ver Dirnagl et al., 2003). Estos animales toleran largos periodos de tiempo en los que la cantidad de oxígeno y glucosa disponible en el organismo es muy pequeña y consiguen mantener la homeostasis celular, en parte a través de la supresión parcial controlada del metabolismo y a través de la alteración de la actividad de los canales iónicos, estrategias ambas que inhiben la función celular. Existen estudios que indican que la “reprogramación génica” que se lleva a cabo tras la inducción de preconditionamiento es similar a la que tiene lugar en estas especies durante los periodos de hibernación (Stenzel-Poore et al., 2003).

El preconditionamiento isquémico cerebral (PCI) no se puede considerar tan sólo un fenómeno experimental, ya que aparece de forma espontánea en la especie humana. Así, pacientes que han sufrido un ataque isquémico transitorio (AIT) en las 72 horas previas a una isquemia ipsilateral, presentan mejor evolución y menor daño neurológico que los que no lo han sufrido (Weih et al., 1999; Moncayo et al., 2000).

En definitiva, el estudio de los mecanismos que están involucrados en el desarrollo de TI es importante para el desarrollo, en un futuro, de herramientas farmacológicas neuroprotectoras para el *ictus*, o bien se ha sugerido como una

estrategia clínica para preparar al cerebro en aquellos pacientes con alto riesgo de padecer una isquemia cerebral.

1.2.2. Modelos experimentales, caracterización y tipos de tolerancia isquémica cerebral.

Desde que se definieran y se demostraran los términos de PCI y TI cerebral, se han utilizado y diseñado muchos modelos animales para reproducir estos fenómenos. Causas naturales de isquemia como, por ejemplo, trombosis o embolismo, pueden inducirse de forma experimental para ocluir los vasos sanguíneos cerebrales más importantes. De esta forma se han diseñado diferentes modelos de preconditionamiento isquémico, que se diferencian en la especie animal en que se realizan, en el tipo de evento isquémico (global o focal), en la duración y en el espacio de latencia entre el evento preconditionante y la isquemia grave (para revisión ver Schaller y Graf, 2002). Como se ha apuntado antes, uno de los primeros modelos experimentales se desarrolló por el grupo de Kitagawa en 1990, donde 2 períodos de 2 minutos cada uno de oclusión de las dos arterias carótidas en el gerbo, se utilizaron como isquemia global y evento preconditionante. Después de 24 horas de reperusión, se volvieron a ocluir ambos vasos durante 6 minutos (isquemia letal), obteniéndose una protección frente a esta última oclusión de entre 53-98%. Un ejemplo de PCI focal seguido de isquemia focal en rata ha sido el desarrollado en nuestro laboratorio. Este modelo fue descrito por vez primera por el grupo de Barone (Barone et al., 1998) pero, en nuestro caso, se hizo junto con la oclusión de la carótida izquierda, para disminuir todavía más el flujo cerebral. Este modelo consta de una oclusión de la carótida y de la arteria cerebral media izquierdas durante 10 minutos. Después de 48 horas de reperusión se ocluyeron ambos vasos de forma permanente para producir una isquemia letal, obteniéndose una protección del 68% (Barone et al., 1998; Brint et al., 1988; Cárdenas et al., 2002).

También se han desarrollado modelos de preconditionamiento isquémico *in vitro*, en los cuales las células se someten a privación de oxígeno y glucosa (POG) durante un corto período de tiempo. Esta maniobra no

produce muerte neuronal pero sí protección frente a una POG posterior de mayor duración (Bruer et al., 1997; Romera et al., 2004).

Otra circunstancia a tener en cuenta y que podría considerarse teóricamente como un modelo de PCI en humanos es el ataque isquémico transitorio o AIT. Como vimos en la clasificación de la isquemia, es un tipo de isquemia focal que se caracteriza por una instauración y aparición de sus síntomas de forma rápida y una duración de pocas horas (menos de 24 horas). Estos síntomas son disfunción motora (disartria, disfunción de un miembro o de una mitad del cuerpo), pérdida de visión en un ojo, pérdida de sensibilidad y afasia. Una vez finalizado este AIT, los síntomas desaparecen rápidamente sin dejar secuelas aparentes; sin embargo, el haber ocurrido un AIT supone que la persona tiene un alto riesgo de sufrir una isquemia grave posterior (NINDS; 1990; Díez-Tejedor et al., 2001). La importancia del AIT radica en su brevedad y su escaso daño tisular. Como vimos, existen muchas evidencias que indican que personas que han sufrido un AIT y después sufren una isquemia grave próxima en el tiempo presentan menor volumen de infarto y mejor pronóstico, lo que indica que el fenómeno de tolerancia también ocurre de forma natural en el hombre.

Por último, muchos modelos experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* se han diseñado empleando como elemento estresante no un período isquémico, sino compuestos químicos, fenómenos físicos, episodios cortos de epilepsia, etc (para revisión ver Kirino, 2002; Blanco et al., 2006). Muchos de estos estímulos nocivos van a desencadenar mecanismos que son compartidos tanto en la fisiopatología de la isquemia cerebral, como por otras patologías cerebrales. Como vemos, existen muchas evidencias experimentales que han demostrado que el estímulo preconditionante puede diferir en su naturaleza de la patología en la que van a desarrollar la tolerancia. Así, en función de estos estímulos, se pueden distinguir tres tipos de tolerancia, a parte de la tolerancia isquémica propiamente dicha:

- Tolerancia cruzada: es la tolerancia que se desarrolla a partir de un estímulo inicial frente a otro posterior de distinta naturaleza (Kirino, 2002). Así, se ha visto que estímulos tales como elevadas presiones de oxígeno, sustancias inflamatorias, eventos epilépticos, inhibición metabólica y radicales libres, hipotermia o hipertermia e incluso

determinados anestésicos pueden producir tolerancia cruzada frente a la isquemia (Dirnagl et al., 2003; Blanco et al., 2006).

- Muchos autores han clasificado como otro tipo de tolerancia la producida frente a LPS (lipopolisacárido), denominada también tolerancia a endotoxinas. Este lipopolisacárido, componente de la pared de las bacterias Gram negativas, se ha utilizado en muchos estudios de preconditionamiento, viéndose que su administración sistémica produce un estado de tolerancia capaz de proteger al cerebro frente a episodios isquémicos graves (Tasaki et al., 1997).
- Tolerancia remota: es aquella en la que el estímulo estresante es aplicado en un órgano y puede, por diferentes vías y mecanismos, producir tolerancia en otro órgano diferente (Dirnagl et al., 2003).

La TI se va a desarrollar en dos fases, distinguiéndose a su vez dos tipos en función del tiempo en el que se producen:

- La tolerancia temprana o fase rápida se establece en minutos e incluso horas, y se caracteriza por cambios que adaptan el metabolismo celular al nuevo estado y por la modificación post-traducciona de proteínas. La activación de proteínas ya existentes y el aumento en la regulación de procesos tales como la extracción de oxígeno parece que también están implicados. Esta fase de la tolerancia confiere protección únicamente para unas horas y es la que fundamentalmente se produce en corazón (para revisión ver Schaller y Graf, 2002; Zemke et al., 2004; Blanco et al., 2006).
- La tolerancia tardía o fase retardada requiere desde horas hasta varios días para desarrollarse y confiere protección durante más tiempo (varios días; Kitagawa et al., 1990). Los mecanismos que participan son la supresión de genes expresados durante la isquemia, produciéndose por tanto una regulación transcripcional que va a suprimir determinadas vías metabólicas, respuesta inmune, reducción de la actividad de canales iónicos, etc. Otro mecanismo implicado y muy importante es la síntesis de nuevas proteínas (Blanco et al., 2006).

Como hemos visto, la producción de tolerancia en cerebro es un fenómeno reproducible, siendo la duración, el período de latencia y el número de episodios isquémicos los únicos factores a tener en cuenta. El evento “precondicionador” no tiene que producir daño, pero tiene que ser lo suficientemente fuerte como para generar tolerancia. El período de latencia, es decir, el periodo entre el preconditionamiento y la isquemia grave, debe ser de al menos un día, tiempo suficiente para que la tolerancia esté instaurada (para revisión ver Barone et al., 1998; Blanco et al., 2006). En cerebro, el curso temporal del desarrollo de tolerancia isquémica parece que sigue el patrón retardado, es decir, necesita de la síntesis de nuevas proteínas para instaurarse, lo que va a conferir protección durante días o incluso varias semanas (Kirino, 2002). Aunque la síntesis proteica se inhibe en las primeras fases de la isquemia cerebral (Cooper et al., 1977), se ha demostrado que en animales preconditionados se recupera, lo que no sucede en animales control (Kato et al., 1995; Barone et al., 1998; Burda et al., 2003).

1.2.3. Mecanismos bioquímicos implicados en el preconditionamiento isquémico cerebral

Durante los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios con el objetivo de clarificar cuáles son los mecanismos y las vías de señalización implicados en la inducción de tolerancia isquémica cerebral, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*. En este apartado revisaremos algunos de los mecanismos más importantes descubiertos en estas investigaciones.

Muchos autores han descrito que para la adquisición de tolerancia isquémica cerebral se necesitan dos componentes celulares: 1) sensores de estrés que puedan detectar las diferentes situaciones de peligro y convertir esa información detectada en señales intracelulares; 2) moléculas efectoras de tolerancia, que acomoden la situación celular y ayuden a combatir esa situación de estrés (Kirino, 2002).

Todos los mecanismos que intervienen en la tolerancia isquémica se pueden dividir en dos categorías:

1) **Mecanismos de defensa celular** frente a la isquemia, que incluyen procesos como la modificación post-traduccional de proteínas ya existentes y la

activación de factores de transcripción, los cuales, a través de la expresión de nuevas proteínas, van a activar diferentes vías encaminadas a la formación de factores de supervivencia o de inhibidores de la apoptosis.

2) La **respuesta celular frente al estrés**, que consiste en la síntesis de proteínas de estrés que contribuyen al mantenimiento de todos los componentes fundamentales de la célula para garantizar su supervivencia. Un ejemplo de esto son las chaperonas, que tienen un papel importante en procesos de renaturalización de proteínas que en situaciones de estrés han perdido su configuración activa.

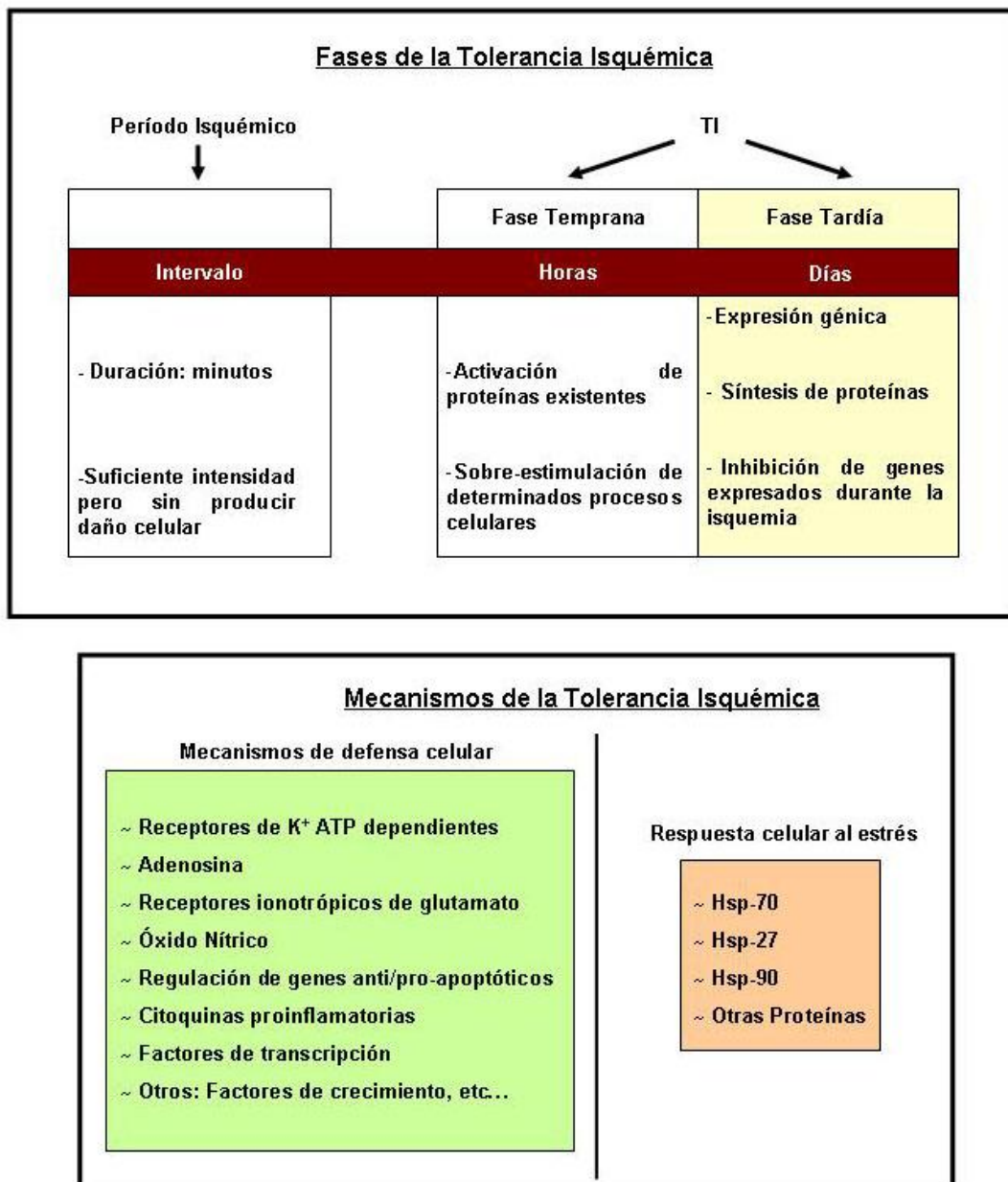


Figura 8: Fases y mecanismos que intervienen en la Tolerancia Isquémica. Modificado de Blanco et al., 2006.

Alguno de los **mecanismos de defensa celular** que han demostrado tener un papel importante en el desarrollo de tolerancia, son:

- **Adenosina y receptores de K^+ dependientes de ATP**

Al igual que en el preconditionamiento cardíaco, el aumento de adenosina tras un evento isquémico juega un papel importante en el preconditionamiento neuronal así como en el desarrollo de la tolerancia temprana. Cuando se produce un período isquémico, debido a la reducción en la producción de ATP, se produce un aumento en las cantidades de adenosina, observándose una inhibición de la transmisión sináptica, una disminución de la liberación de glutamato estimulado por K^+ y una inhibición de la entrada en la neurona presináptica de Ca^{2+} a través de su unión a los receptores de adenosina A_1 . Se ha demostrado que todas estas acciones se deben a la activación por parte de la adenosina de los canales de K^+ dependientes de ATP de la neurona presináptica. La entrada de K^+ ayuda a la repolarización de la neurona presináptica, disminuyendo todos los eventos que se producen cuando se despolariza como consecuencia de una isquemia (para revisión ver Heurteaux et al., 1995). Estos hallazgos se han demostrado mediante el empleo de sustancias que disminuyen el consumo de adenosina, aumentando la tolerancia, o mediante la inhibición de dichos receptores, observándose la disminución de la TI (Heurteaux et al., 1995; Hiraide et al., 2001; Nakamura et al., 2002; Blanco et al., 2006).

- **Receptores ionotrópicos y transportadores de glutamato**

Como se ha venido explicando, la activación de los receptores NMDA durante la isquemia causa, entre otras cosas, la entrada de Ca^{2+} y Na^+ , y la salida de K^+ de la neurona postsináptica, originando su despolarización y los consiguientes eventos deletéreos para el tejido cerebral. Hasta la fecha se han descrito cinco subtipos de receptores NMDA: NR1, NR2A, NR2B, NR2C y NR2D, y existen algunas evidencias experimentales que los implican en el desarrollo de tolerancia isquémica. Un ejemplo es la demostración de que el preconditionamiento isquémico es capaz de reducir la expresión de algunos de estos subtipos de los receptores NMDA. De esta forma, cuando se produce la isquemia grave posterior, las neuronas poseen un

menor número de estos receptores, entrando menos Ca^{2+} en su interior, y reduciéndose por tanto todos los eventos deletéreos activados por este catión (Shamloo y Wieloch, 1999). Otras observaciones relacionadas con los receptores NMDA indican que la entrada moderada de Ca^{2+} mediada por estos receptores puede ser importante en la mayoría de los modelos de preconditionamiento isquémico debido a la activación de programas de supervivencia celular (Grabb y Choi, 1999).

Como vimos, otro tipo de receptores ionotrópicos para el glutamato son los receptores AMPA, responsables en parte tras su activación de la entrada de Na^+ y Ca^{2+} . Se sabe que están formados por cuatro subunidades que forman un poro a través del cual los iones van a pasar al interior de la célula. Una de estas subunidades, GluR2 ha sido estudiada en profundidad y se ha observado que en algunas circunstancias, se produce un cambio de una glutamina por arginina en su ARNm, haciendo que el canal donde se encuentra sea impermeable al Ca^{2+} . Existen algunos estudios en modelos de preconditionamiento en que se ha demostrado el aumento de esta subunidad, o la disminución en la expresión de GluR2, proponiéndose esto como uno de los mecanismos que participan en el desarrollo de tolerancia (Yamaguchi et al., 1999; Tanaka et al., 2002).

Por otro lado, otra vía importante en la producción de tolerancia isquémica podrían ser los transportadores de glutamato. Como vimos, estos transportadores son los encargados de recaptar el glutamato del espacio sináptico al interior de la célula, para así poner fin a la transmisión glutamatérgica y evitar el daño excitotóxico de este neurotransmisor. Al comienzo del presente trabajo no existían evidencias sobre la implicación de estos transportadores en la TI, pero recientemente, nuestro grupo de trabajo ha demostrado la implicación de algunos transportadores, en concreto EAAT2 y 3 en la TI en modelos *in vitro* de preconditionamiento isquémico cerebral (Romera et al., 2004; Romera et al., 2007).

▪ Neuroprotección mediada por NO

A pesar de que el NO es uno de los principales mediadores del daño producido tras la isquemia, puede tener también efectos neuroprotectores y estar implicado en los mecanismos de desarrollo de tolerancia. Estos efectos

neuroprotectores van a ser diferentes en función de la sintasa de NO que se active. De esta forma, el equipo de Gidday demostró en un modelo de preconditionamiento hipóxico que para la adquisición de tolerancia era necesaria la activación de la eNOS que, como sabemos participa en el control del tono vascular (Gidday et al., 1999). También se ha implicado a la nNOS en la producción de tolerancia, y su activación es dependiente de los receptores NMDA (Centeno et al., 1999; Grabb y Choi, 1999); pero sin duda, el NO producido por la iNOS es el que posee acciones más contundentes en el desarrollo de tolerancia isquémica. Este NO puede ser beneficioso por promover vías de señalización que, como último término, van a producir la protección de la mitocondria (Cho et al., 2005). También se ha demostrado que la tolerancia isquémica producida por el empleo de algunos anestésicos volátiles, es dependiente de iNOS (Kapinya et al., 2002).

El NO lleva a cabo sus acciones neuroprotectoras a través de dos vías de señalización importantes para la supervivencia neuronal, la vía Ras/Rasf/MEK/ERK y la vía PI3 quinasa (PI3K)/Akt. Ambas vías son fundamentales para el normal desarrollo del cerebro, proceso en el que cierto número de células van a sufrir apoptosis. También son determinantes en la vulnerabilidad selectiva de las neuronas ante isquemia, neurodegeneración y en la tolerancia proporcionada por el preconditionamiento (para revisión ver Huang, 2004).

- Regulación de la apoptosis

La inducción de una isquemia cerebral produce una regulación diferencial en los genes implicados en apoptosis. Así, la expresión del gen efector de apoptosis *bax* se ve aumentado en células destinadas a morir (como las CA1, que son muy sensibles a isquemia), mientras que en las destinadas a sobrevivir (por ejemplo las de la capa CA3, que son mucho más resistentes) es el gen anti-apoptótico *bcl-2* el que ve aumentada su expresión. Estos datos indican que el balance Bcl-2/Bax es responsable, al menos en parte, del destino final de las células hacia la muerte o hacia la supervivencia (Shimizu et al., 2001).

Entre los factores de transcripción que conducen a la sobreexpresión de Bcl-2 durante la tolerancia tienen especial relevancia las proteínas de unión a los elementos de respuesta a cAMP (CREB), ya que su promotor contiene un elemento de respuesta a cAMP (CRE).

Diversas proteín-quinasas pueden activar la transcripción a través de CRE, mediante la fosforilación de CREB. Este aumento en la fosforilación se ha llegado a observar incluso varios días después de una isquemia en células resistentes a daño isquémico (Hu et al., 1999). También se ha descrito que, en células sometidas a preconditionamiento isquémico, tiene lugar un aumento en la fosforilación de CREB en la penumbra isquémica (Nakajima et al., 2002).

Esta activación de la transcripción inducida por CREB es también dependiente de la concentración de Ca^{2+} intracelular y, por lo tanto, de la activación de los receptores NMDA (para revisión ver Zemke et al., 2004).

▪ Citoquinas pro-inflamatorias

Como se indicó en el apartado del daño inflamatorio producido tras la isquemia, muchos de los mediadores que tienen un papel importante en este daño son esenciales para el desarrollo de la tolerancia isquémica. Algunos de estos mediadores inflamatorios son $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$.

En los años 90, el equipo de Ohtsuki demostró, en un modelo de isquemia subletal en gerbo, que la $\text{IL-1}\beta$, a través de su receptor tipo 1, reducía la muerte neuronal en la capa CA1 del hipocampo en aquellos animales que habían sido preconditionados. Así se demostró el papel de esta citoquina en el desarrollo de tolerancia isquémica (Ohtsuki et al., 1996).

De manera similar se descubrió en ratas espontáneamente hipertensas que el pre-tratamiento con dosis bajas de LPS entre 2 y 4 días antes de una oclusión de la arteria cerebral conseguía disminuir significativamente el volumen de infarto (Tasaki et al., 1997). Ya se sabía que la inyección de LPS producía liberación de $\text{TNF-}\alpha$, pero la observación de que cuando se inyectaba junto con el LPS una proteína capaz de bloquear esta citoquina desaparecía la tolerancia, demostró la implicación de ésta en los procesos de preconditionamiento isquémico.

Además en el mismo año se pudo demostrar que el pre-tratamiento de ratones con TNF- α les protegía del daño inducido por MCAO (Nawashiro et al., 1997). Un trabajo de nuestro laboratorio inmediatamente anterior al desarrollo de esta tesis, ha descrito que en el PCI mediado por TNF- α está implicada su enzima convertidora (TACE; Cárdenas et al., 2002).

Uno de los efectos del aumento en la liberación de TNF- α que se produce tras isquemia es la translocación del factor nuclear κ B (NF κ B) al núcleo. Este factor, aparte de su papel en la inflamación, juega un papel importante en la inducción de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o MnSOD (superóxido dismutasa dependiente de Mn), que se sabe que participan en la inducción de tolerancia (Toyoda et al., 1997).

Otros mediadores descritos más adelante y que se han postulado recientemente en el desarrollo de TI, son los receptores *Toll-like* (TLRs). La producción de citoquinas después de la isquemia se inicia por la activación de estos receptores, los cuales reconocen moléculas derivadas del daño tisular activándose y poniendo en marcha la respuesta inflamatoria (para revisión ver Kariko et al., 2004). De hecho en nuestro grupo, en un modelo *in vivo* de isquemia cerebral en ratón, ha demostrado que la deficiencia en TLR4, uno de los TLRs, produce menor volumen de infarto y menor daño inflamatorio (Caso et al., 2007). Aun así, la implicación de los TLRs en el desarrollo de TI, así como los mecanismos que intervienen no están demostrados todavía.

▪ Factores Nucleares

Uno de los factores de transcripción que intervienen en el desarrollo de TI y, por tanto que activan mecanismos de defensa celular, es el factor nuclear κ B (NF- κ B; Blondeau et al., 2001; Ginis et al., 2002). Como se ha descrito anteriormente, este factor, aparte de intervenir en el daño inflamatorio tras la isquemia, juega un papel importante en la supervivencia neuronal, y se activa por la acción de diferentes señales, tales como citoquinas, factores neurotróficos, neurotransmisores, estrés oxidativo y por la elevación de Ca²⁺ intracelular (para revisión ver Mattson et al., 2000). Hasta la fecha se han descrito cinco miembros de la familia NF- κ B, siendo la forma más común para este factor el heterodímero formado por p50-p65. En condiciones normales,

NF- κ B se encuentra en el citoplasma unido a un complejo proteico denominado I κ B. En respuesta a cualquiera de los estímulos anteriormente mencionados, se activan unas quinasas, denominadas quinasas de I κ B (IKKs), que van a fosforilar a la proteína inhibidora de este factor, I κ B, siendo degradada esta proteína por el proteasoma y liberando así a NF- κ B. Este factor migrará al núcleo celular promoviendo la expresión de al menos 150 genes (para revisión ver Chen y Manning, 1995; Verma et al., 1995; Baeuerle y Baltimore, 1996).

Como se ha citado antes, la activación de NF- κ B juega un papel importante en la inducción de genes protectores e implicados en la TI, por tanto su inhibición conlleva a la pérdida de la neuroprotección mediada por el PCI (Kirino, 2002).

Otro factor importante en el desarrollo de TI es el factor inducible por hipoxia (HIF-1). HIF-1, en condiciones de hipoxia, dimeriza y se une al ADN para regular la expresión de diferentes genes (Wang et al., 1995), estando implicados una gran parte de ellos en la neuroprotección. Algunos ejemplos son los genes de enzimas importantes para el metabolismo y transporte de la glucosa (Jones y Bergeron, 2001) o del VEGF, del que se ha observado que no sólo posee propiedades neuroprotectoras sino que también estimula la angiogénesis (Waltenberger et al., 1999).

▪ Otros mecanismos de defensa

Por último, otros mecanismos que se han implicado en la TI son la fosforilación de determinadas proteínas, la expresión de genes tempranos, tales como c-fos, factores neurotróficos como el factor de crecimiento neural o NGF, etc.... (para revisión ver Kirino, 2002; Blanco et al., 2006).

En cuanto a la **respuesta celular al estrés**, se ha demostrado que son importantes para la inducción de tolerancia la expresión de proteínas de estrés, conocidas también como “heat shock proteins”, HSPs o chaperonas. Cuando una célula es sometida a cualquier tipo de estrés, muchos de sus componentes se dañan, como es el caso de las proteínas o el ADN. En condiciones normales, estos componentes van siendo degradados o reparados por diferentes mecanismos que posee la célula y que son muy importantes para su correcto funcionamiento. Estas funciones se realizan fundamentalmente por chaperonas que se encargan de renaturalizar o de degradar proteínas dañadas. Cuando estos sistemas de “limpieza o reorganización” fallan, se desencadena la muerte celular por apoptosis (para revisión ver Blanco et al., 2006).

Se ha demostrado en diferentes modelos experimentales que, tras el preconditionamiento isquémico, aumenta la expresión de Hsp70 (Kirino et al., 1991; Nishi et al., 1993). De hecho se ha correlacionado la expresión de Hsp70 con el grado de tolerancia, observándose que la expresión de esta proteína está mediada por los receptores NMDA (Kato et al., 1992).

Otras proteínas de estrés que aumentan tras el PCI son Hsp27, Hsp90 y Hsp110/105 (Blanco et al., 2006).

1.2.4 Expresión clínica de la tolerancia isquémica.

Desde hace algunos años se utiliza en clínica la inducción de tolerancia isquémica en el corazón en determinados procesos en los que el riesgo de sufrir una isquemia cardiaca es muy elevado. Los pioneros en la utilización de esta técnica fueron los miembros del grupo de Yellon, que demostraron que dos periodos de preconditionamiento de 3 minutos de duración antes de la realización de un “bypass” de arteria coronaria eran capaces de disminuir notablemente el daño en el corazón (medido como niveles de troponina) que causaba el procedimiento (Yellon et al., 1993). La inducción de PCI se ha utilizado también para disminuir el daño tras cirugía en casos de resección hepática (Clavien et al., 2000) y de cirugía pulmonar (Chen et al., 1999).

En el caso de la isquemia cerebral se conoce desde hace algunos años el efecto neuroprotector de los AITs (ataque isquémico transitorio) frente a

isquemias posteriores que tienen lugar en un periodo de tiempo inferior a 3 días, de manera que los pacientes que han sufrido un AIT hasta 72 horas antes de una isquemia grave presentan mejor evolución y menor déficit neurológico que los que no lo habían sufrido (Weih et al., 1999; Moncayo et al., 2000), y que uno de los mediadores implicados era TNF- α (Castillo et al., 2003). Estas observaciones se han podido confirmar posteriormente mediante estudios de resonancia magnética, cuyos resultados demuestran que los pacientes que han sufrido un AIT previo a la isquemia presentan menor volumen de infarto (Wegener et al., 2004).

1.3. VÍAS DE NEUROPROTECCIÓN ENDÓGENA: Papel de TNF- α , de su enzima convertidora y de TLR4.

1.3.1. TNF- α y superfamilia de proteínas TNF

El factor de necrosis tumoral o TNF- α fue descubierto casualmente por William Coley en 1893. Este investigador observó que en los pacientes con cáncer que desarrollaban una infección bacteriana se inducía una regresión del tumor por necrosis celular. Con la esperanza de curar esta enfermedad, Coley administró el sobrenadante de algunos cultivos bacterianos (conocido también como toxinas de Coley) a pacientes con cáncer y observó que tenía cierta actividad en la necrosis tumoral, pero tenía efectos secundarios muy graves. No fue hasta 1975 cuando se demostró que el sobrenadante de Coley tenía en realidad unas endotoxinas bacterianas que estimulaban a las células del sistema inmune y estas a su vez secretaban una sustancia que sí tenía un efecto antitumoral, siendo bautizada con el nombre de factor de necrosis tumoral (Carswell et al., 1975). De todos los miembros de esta superfamilia, nos vamos a centrar en TNF- α , por tener un papel muy importante en el desarrollo de esta tesis doctoral.

La familia de ligandos TNF está compuesta por 19 proteínas codificadas por 18 genes. Son proteínas monotriméricas transmembrana, que se caracterizan por tener un dominio muy conservado entre todas ellas en la

región C-terminal (20-30% de homología entre todos los miembros de la familia) que se conoce como dominio de homología de TNF (THD). El THD es una secuencia de 150 aminoácidos que parece ser la parte que permite a estas proteínas unirse a sus receptores para ejercer así su acción. Las proteínas de esta superfamilia dentro del THD comparten un plegamiento terciario que es el responsable de que se produzca la trimerización necesaria para su correcta función.

Aunque la mayoría de proteínas de esta familia se sintetizan como proteínas unidas a la membrana, algunos pueden transformarse y liberarse en forma soluble tras un procesamiento. En esta liberación se han implicado diferentes proteínas como las metaloproteasas de la familia ADAM (*a disintegrin and a metalloprotease*), las matrilisinas y miembros de la familia de las furinas tipo subtilisina. Este procesamiento es esencial para la función fisiológica de algunas proteínas de esta superfamilia, mientras que para otros es una forma de inhibir su acción (para revisión ver Bodmer et al., 2002).

Las proteínas de esta familia ejercen funciones muy importantes dentro de la respuesta inmune e inflamatoria a diferentes niveles. Algunas de estas proteínas, como TNF, $LT\alpha$, $LT\beta$ y RANKL, son importantes durante el desarrollo, proporcionando señales para la morfogénesis de los órganos linfoides secundarios (para revisión ver Locksley et al., 2001). También están implicadas en los mecanismos que dan lugar a la correcta activación de los precursores de las células del sistema inmune, para garantizar que ejerzan su acción de manera competente. Sin embargo, la excesiva o inapropiada expresión de los miembros de esta familia se ha asociado con diferentes procesos y enfermedades en los que la inflamación juega un papel importante. Algunas de estas patologías son el shock séptico, la artritis reumatoide o el daño inflamatorio producido en la isquemia cerebral.

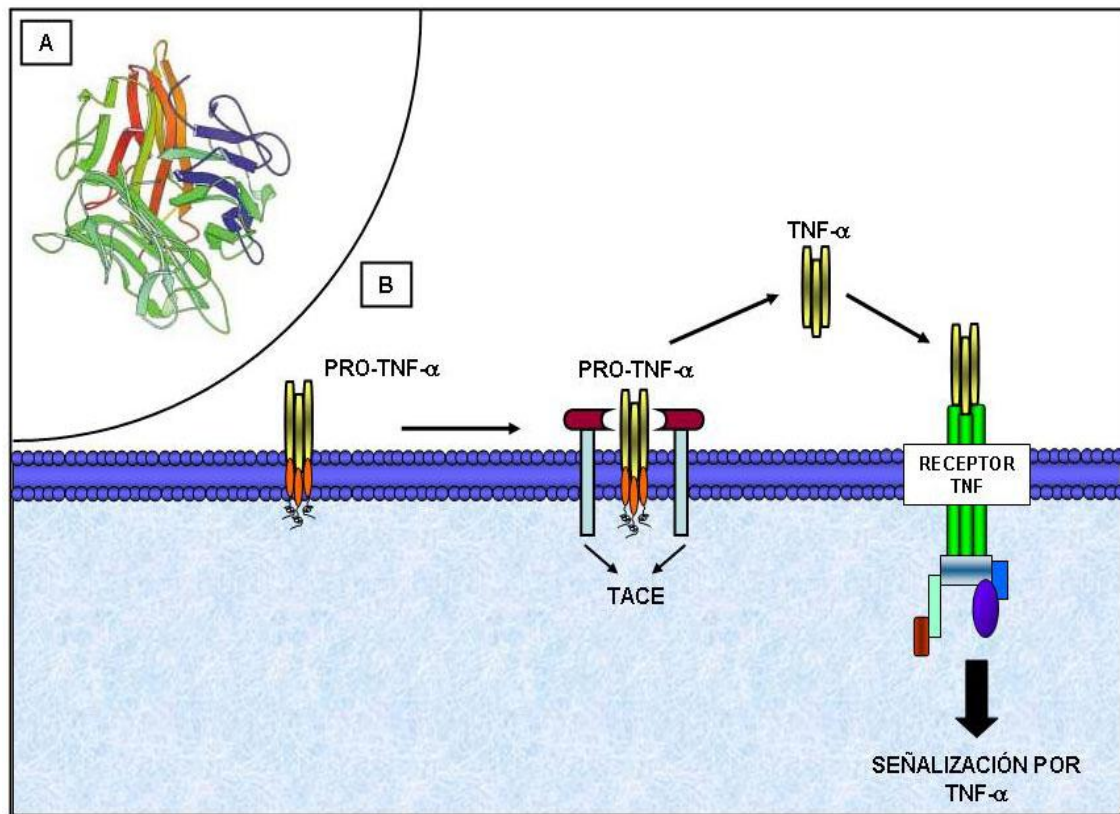


Figura 9: (A) Estructura tridimensional de TNF- α . (B) Esquema en el que se describe el procesamiento de TNF- α por TACE/ADAM17 y su posterior unión a sus receptores.

1.3.2. Señalización de TNF- α a través de sus receptores

Los ligandos de la familia TNF llevan a cabo sus funciones biológicas mediante la interacción con sus receptores de membrana, agrupados dentro de la familia de *receptores de TNF* (para revisión ver Wajant et al., 2003). Estos receptores poseen en su región extracelular de 1 a 6 dominios ricos en cisteína (cystein-rich domains; CDRs), que contienen seis residuos de este aminoácido formando tres puentes di-sulfuro en cada dominio (para revisión ver Bodmer et al., 2002). De todos los receptores que forman esta familia (se conocen unos 30), TNF- α únicamente interacciona con dos: TNFR1 (p55) y TNFR2 (p75; Figura 10). Estos receptores son glucoproteínas transmembrana que presentan sólo un 28% de homología en su secuencia entre ellos, sobre todo en la región extracelular, donde se encuentran los CDRs. En esta región aparece un “dominio de ensamblaje previo a la unión de ligando” (PLAD) que induce la trimerización del receptor en presencia de ligando (Chan et al., 2000).

TNFR1 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos, mientras que la expresión de TNFR2 se encuentra muy regulada y se observa sobre todo en células del sistema inmune; de hecho, en la mayoría de los tipos celulares parece ser TNFR1 el que actúa como mediador principal de la señalización por TNF- α , mientras que TNFR2 parece ser más importante cuando se trata del sistema linfoide.

Los dominios extracelulares de ambos receptores pueden ser procesados proteolíticamente, liberándose fragmentos solubles con capacidad neutralizante. Al igual que TNF- α , TNFR2 es procesado por la enzima convertidora de TNF- α (TACE), cuya función e importancia trataremos más adelante. En el caso de TNFR1 se ha demostrado que también es procesado por TACE, pero en este procesamiento podrían intervenir otras proteínas con capacidad de corte, siendo necesario un mayor estudio sobre todos estos mecanismos (para revisión ver Smalley and Ley, 2005).

El dominio intracelular de los receptores de TNF- α , que no posee por sí mismo actividad enzimática, los define como representantes de los dos subgrupos principales de la familia de receptores de TNF: los que contienen dominio de muerte (DD) y que se conocen como receptores de muerte, como TNFR1 y los que no poseen dominio de muerte, como TNFR2.

TNFR1 presenta un DD de unos 80 aminoácidos cerca del C-terminal. Este dominio se encuentra en un gran número de proteínas y moléculas relacionadas que están implicadas en la señalización de muerte celular. Entre ellas se encuentra la proteína silenciadora de dominios de muerte (SODD) que se une al DD de TNFR1, evitando la unión de otras proteínas (Jiang et al., 1999; Figura 10).

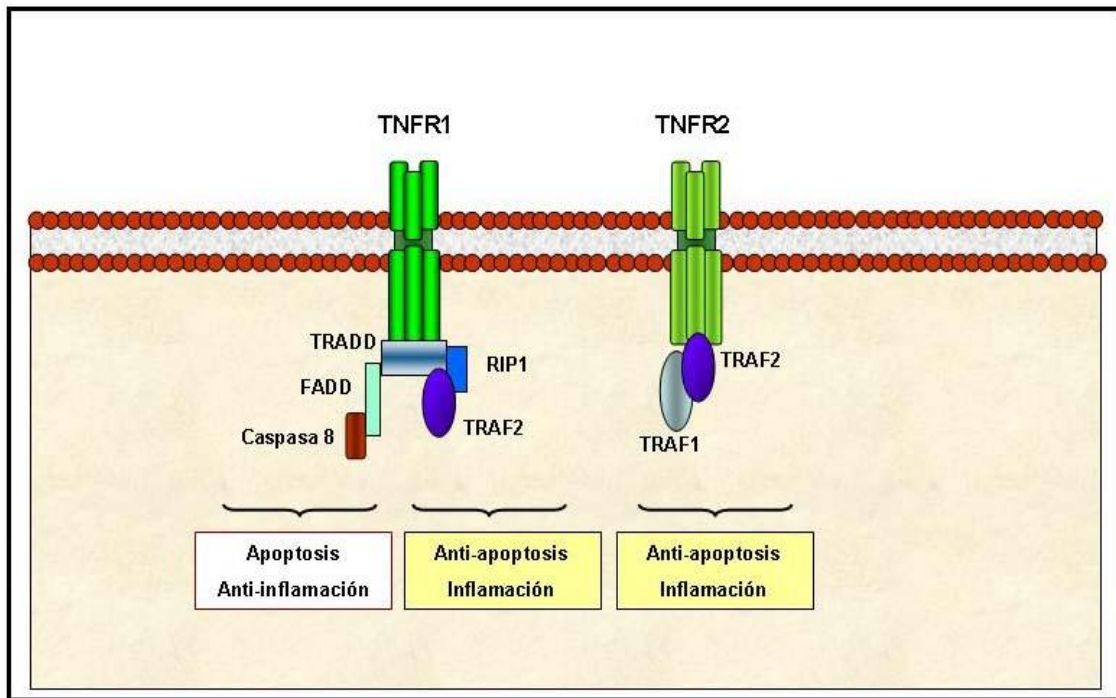


Figura 10: Señalización a través de los receptores de TNF- α , TNFR1 y TNFR2.

TNF- α estimula la trimerización de TNFR1 y la liberación de SODD de su dominio intracelular, de manera que puedan unirse otras proteínas (para revisión ver MacEwan, 2002). El dominio resultante es reconocido por la proteína adaptadora TRADD (dominio de muerte asociado al receptor de TNF- α), que funciona como una plataforma que recluta proteínas adaptadoras como RIP (proteína de interacción con el receptor), TRAF2 (factor asociado a TNFR), FADD (dominio de muerte asociado a Fas) o IAPs (proteínas inhibidoras de apoptosis).

FADD contiene dos dominios funcionales estructuralmente distintos, un DD en C-terminal necesario para el reclutamiento del complejo TNFR1 y un dominio efector de muerte (DED) que da lugar a la activación de una reacción proteolítica y de la cascada de caspasas, que van a desencadenar apoptosis. Sin embargo, TRAF2 y RIP van a activar NIK (quinasa inductora de NF κ B), que activará IKK (quinasa de I κ B). Esta proteína va a fosforilar a I κ B α , que será degradada, permitiendo que NF κ B se transloque al núcleo para activar la transcripción de distintos genes (para revisión ver Hu, 2003).

TNFR2 no contiene dominio de muerte, pero también puede reclutar proteínas adaptadoras como TRAF2. Se piensa que este receptor es capaz de desencadenar vías apoptóticas de forma directa o a través de un mecanismo de traspaso de ligando, de forma que, aprovechando su gran afinidad por TNF- α y su rápida disociación, aumenta la concentración de esta citoquina en las proximidades de TNFR1, dando lugar a su activación (Tartaglia et al., 1993).

1.3.3. TNF- α y su enzima convertidora

En condiciones fisiológicas, el TNF- α se encuentra en las células en dos formas: como una molécula de 26 KDa, que se encuentra unida a la membrana (mTNF- α), y en forma soluble, con un peso molecular de 17 KDa (sTNF- α). La forma soluble procede de la unida a membrana a través de la acción de una enzima que produce su procesamiento proteolítico, liberando el C-terminal de la superficie celular. Esta proteína se conoce como TNF- α convertasa, TACE o ADAM17 (Black et al., 1997; Moss et al., 1997).

TACE pertenece a la familia de proteínas ADAM (*a* disintegrin and *a* metalloprotease) cuyos miembros se caracterizan por presentar un dominio con actividad desintegrina y otro con actividad metaloproteasa, y que se engloban, junto con las metaloproteasas de matriz (MMPs) en la superfamilia de las metzincinas (para revisión ver Black, 2002).

Las proteínas de la familia ADAM comparten una estructura común. Son proteínas de unos 750 aminoácidos que contienen múltiples dominios. Están formadas por un pro-dominio, una región metaloproteasa, un dominio desintegrina, una región rica en cisteína, un módulo transmembrana y una cola citoplasmática (para revisión ver Moro et al., 2003). De las 29 ADAMs descritas, solo ADAM 10 presenta homología de secuencia con TACE. TACE es una proteína transmembrana de tipo I con múltiples dominios, que además contiene un dominio catalítico dependiente de zinc y una región desintegrina rica en cisteína (figura 11). Como ocurre también en otras metzincinas, el pro-dominio contiene un residuo de cisteína que interacciona con el zinc del sitio activo del dominio catalítico y que debe ser desplazado para que se produzca la activación de la enzima.

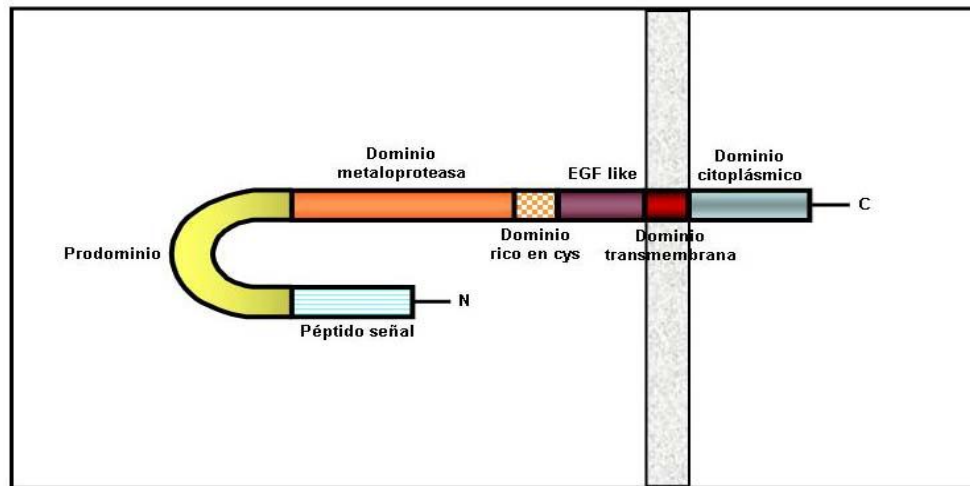


Figura 11: Estructura de la enzima convertidora de TNF- α (TACE/ADAM17).

No se conoce exactamente cuál es la función del dominio desintegrina, pero algunos estudios indican que podría estar implicado en la regulación de la activación de la enzima a través de la interacción con determinadas integrinas (Bax et al., 2004).

En la mayoría de los tejidos, TACE es una enzima constitutiva. También su procesamiento parece llevarse a cabo constitutivamente, probablemente por la acción de una furina o de una proteína relacionada, en un compartimento del Golgi posterior. Una vez procesada, se transloca a la superficie celular (para revisión ver Black, 2002). Los mecanismos que regulan la actividad de TACE son aún bastante desconocidos. Por un lado, las secuencias que procesa en los distintos sustratos son muy variables, así que uno de los pasos de la regulación podría afectar a los factores que hacen que una determinada proteína sea sustrato de esta enzima. Probablemente sean necesarias interacciones que tienen lugar lejos del sitio de procesamiento, e incluso algunos estudios apuntan a que en ellas podría estar implicado el dominio rico en cisteína (para revisión ver Moro et al., 2003). Además, en algunos casos, para que la unión del sustrato sea efectiva, es necesario que tanto la enzima como el sustrato se encuentren anclados a la membrana, como ocurre en el caso del receptor de TNF- α p75 o TNFR2.

Tanto la expresión de TACE como su actividad varían, según el contexto de daño tisular, como son situaciones de neuroinflamación que incluyen el

ictus, la esclerosis múltiple o traumatismos, en los que se sabe que existe un aumento de TNF- α (Moro et al., 2003). De hecho, en modelos experimentales de isquemia cerebral se ha descrito que existe un aumento en la expresión de esta proteína (Hurtado et al., 2001; Hurtado et al., 2002). En estos modelos la vía TACE/TNF- α posee un papel patológico, ya que está implicada en el aumento de expresión de iNOS, que da lugar a la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, con el consiguiente efecto neurotóxico (Hurtado et al., 2001).

También se ha probado la implicación de TACE en otros modelos de enfermedades psiquiátricas como el estrés físico-psicológico (Madrigal et al., 2002), la enfermedad de Alzheimer (Buxbaum et al., 1998) o las encefalopatías espongiiformes (Diaz et al., 2001). Además en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado, que el estrés previo a la isquemia cerebral, agrava todavía más el daño cerebral, y que esto se produce en parte por la sobreexpresión de esta vía, TACE-TNF- α -TNFR1 (Caso et al., 2006).

Sin embargo como hemos ido viendo a lo largo de esta introducción, el aumento en la expresión de TACE y TNF- α no sólo está implicado en la producción de daño, sino que puede tener un papel neuroprotector por ser uno de los mecanismos de inducción de tolerancia isquémica (Cárdenas et al., 2002).

1.3.4. Posible papel de TLR4 en la TI

Como se ha indicado en capítulos anteriores, es bien conocida la inducción de tolerancia isquémica tras la administración de LPS por vía sistémica. Hasta el momento el receptor principal de este componente de la pared de las bacterias Gram negativas, es el TLR4 (O'Neill, 2004). Se sabe por experimentos realizados en monocitos y macrófagos, que cuando LPS se une a TLR4, inicia una vía de señalización que desemboca en la activación de NF- κ B. La activación de este factor de transcripción conduce a la liberación de citoquinas, quimioquinas, enzimas proinflamatorias, en definitiva, factores inflamatorios relacionados tanto con el daño producido tras la isquemia, como en el desarrollo de tolerancia isquémica (Kariko et al., 2004). Por tanto,

debido a que en la actualidad no existen evidencias que impliquen directamente a TLR4 en la inducción de TI cerebral, y que todos los mediadores inflamatorios activados por este receptor se han implicado en la inducción de TI, parece lógico pensar un posible papel de TLR4 en estos fenómenos.

Por último, y teniendo en cuenta todos estos datos, parece importante la implicación de la vía TACE-TNF- α y del TLR4 tanto en la producción de daño celular como en la neuroprotección tras la isquemia cerebral. Por todo ello se hace necesario un profundo estudio de todos los mediadores que intervienen en estas vías para, en un futuro no muy lejano, diseñar fármacos que regulen su actividad con el fin de conseguir efectos beneficiosos en las enfermedades en las que participa.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. JUSTIFICACIONES, ANTECEDENTES E HIPÓTESIS

Desde hace algunos años se conoce el fenómeno de tolerancia isquémica cerebral. Por este fenómeno, un período isquémico de corta duración confiere protección ante otro período isquémico más grave y cercano en el tiempo. Los mecanismos por los que esta tolerancia se desarrolla no se conocen a la perfección, siendo por tanto necesario ahondar en estas investigaciones para su mejor conocimiento y un posible desarrollo de fármacos neuroprotectores que ayuden en el tratamiento y la prevención del *ictus* isquémico.

En la tolerancia se han implicado diferentes mecanismos, algunos de ellos estudiados en nuestro grupo de trabajo. Uno de ellos, y que tiene especial importancia en el desarrollo de esta tesis doctoral, es la activación del factor de transcripción NF- κ B (Blondeau et al., 2001; Ginis et al., 2002). Se sabe que este factor juega un papel importante en la supervivencia neuronal y que se activa por la acción de diferentes señales, siendo algunas de ellas citoquinas pro-inflamatorias como, por ejemplo, TNF- α (Shohami et al., 1999; Liu et al., 2000; Wang et al., 2000). Al inicio de la presente tesis, en nuestro laboratorio se había demostrado el papel tanto de TNF- α como de su enzima convertidora, TACE/ADAM17 en la TI experimental *in vivo* (Cárdenas et al., 2002). En concordancia con estos resultados, en un estudio realizado en pacientes con *ictus*, se observó que elevados niveles en plasma de TNF- α están asociados con la tolerancia isquémica cerebral humana (Castillo et al., 2003).

Por otro lado y relacionado con la excitotoxicidad por glutamato en la isquemia cerebral, es sabido que los transportadores para este neurotransmisor son muy importantes para la detoxificación de este aminoácido excitador del espacio extracelular. Por este motivo y debido a que no existían evidencias directas que implicaran a los EAATs en el desarrollo de TI,

decidimos estudiar si podían producirse variaciones en la expresión de los mismos y si la activación de la vía TACE/TNF- α regulaba la expresión a través de la activación de NF- κ B de alguno de los EAATs estudiados en nuestro modelo *in vivo* de PCI.

Por último y como se ha citado en la introducción, hace algunos años se descubrieron los receptores Toll-like, cuyo papel es muy importante en la puesta en marcha de la respuesta inmune innata (Medzhitov, 2001; O'Neill, 2004). Estos receptores van a activar vías inflamatorias, que se sabe que intervienen en la fisiopatología del *ictus*. De hecho, existen varios trabajos, uno de ellos realizado en nuestro laboratorio, que implican directamente a TLR4 en la producción de mediadores inflamatorios tras la isquemia experimental (Caso et al., 2007). Se conoce el papel de muchos de estos mediadores inflamatorios en el desarrollo de tolerancia isquémica, pero hasta la fecha no existen evidencias experimentales que impliquen directamente a TLR4 en el desarrollo de estos fenómenos.

Por tanto, teniendo en cuenta todos estos antecedentes nos planteamos las siguientes hipótesis:

- 1) La vía inflamatoria TACE/TNF- α y los mecanismos de recaptación de glutamato están implicados y relacionados en los fenómenos de PCI a través de mecanismos comunes como la activación de NF- κ B.**
- 2) TLR4 media la TI a través de mecanismos inflamatorios y a través de la activación de NF- κ B.**

Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

Bloque I

- 1) Comprobar la validez del modelo *in vivo* de preconditionamiento isquémico cerebral en rata empleado anteriormente en nuestro laboratorio.

- 2) Analizar la expresión y localización celular de TACE y su participación junto con TNF- α en la tolerancia isquémica cerebral en dicho modelo.
- 3) Estudiar el efecto del preconditionamiento isquémico sobre la expresión de los TNFRs y sobre la activación de NF- κ B, así como su papel en la tolerancia isquémica.
- 4) Analizar de la expresión de los transportadores de glutamato (EAATs) como posible diana de la señalización inducida en nuestro modelo *in vivo* de PCI.
- 5) Estudiar del papel de la vía TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B sobre la expresión de estos transportadores y su papel en la tolerancia isquémica cerebral.

Bloque 2

- 6) Poner a punto un modelo *in vivo* de preconditionamiento isquémico cerebral en ratón
- 7) Estudiar la participación de TLR4 en la TI en ratón, utilizando ratones control y deficientes en TLR4.
- 8) Analizar el papel de TLR4 sobre la activación de NF- κ B tras el PCI.
- 9) Estudiar del efecto de TLR4 sobre la expresión de mediadores inflamatorios (iNOS, COX2 y MMP9) después del PCI.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. SUJETOS DE EXPERIMENTACIÓN

En la realización de esta tesis doctoral, para los experimentos del bloque I se han empleado ratas macho adultas Fischer, con un peso comprendido entre 240-260g. Para el bloque II se han utilizado ratones adultos macho C57BL con un peso de 28-30g. Dentro de esta cepa de ratón se han utilizado dos estirpes, ratones C57BL/10ScNJ (ScNJ), que presentan una delección total del gen de TLR4 (Politorak et al., 1998) y ratones C57BL/10ScSn (ScSn), que expresan esta proteína y se han utilizado como controles. El mantenimiento y cuidado de estos animales se realizó de acuerdo con lo estipulado por el Comité de Cuidados Animales de la Universidad Complutense de Madrid (dentro de la normativa de la Unión Europea DC86/609/CEE). Durante toda la experimentación, a los animales se les permitió libre acceso a comida y agua.

BLOQUE I

3.2. MODELOS EXPERIMENTALES DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO E ISQUEMIA CEREBRAL EN RATA

3.2.1. MODELO DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CEREBRAL FOCAL

El preconditionamiento isquémico focal (PCI) se realizó siguiendo un modelo utilizado ya en nuestro grupo de trabajo y descrito en Cárdenas et al., en el año 2002. Este modelo consiste en el aislamiento y oclusión temporal de la Carótida Común (CCA) y la Arteria Cerebral Media (MCA) izquierdas durante un tiempo de 10 minutos (Barone et al., 1998; Brint et al., 1988). Los animales fueron anestesiados con Halotano o Isoflurano al 2% en una mezcla de óxido nitroso (70%) y oxígeno (30%) y la temperatura corporal se mantuvo a 37°C durante toda la operación mediante el empleo de una manta térmica (LSI

LETICA, HB 101/2; Panlab S.L., Cornellà, España). Para la oclusión transitoria de la CCA izquierda, tras rasurar y desinfectar con una solución yodada la zona ventral del cuello, se realizó una incisión de aproximadamente 1,5cm, aislándose dicha arteria y ocluyéndola con la ayuda de un clip. Para la oclusión transitoria de la MCA (tMCAO), tras rasurar la zona cercana al ojo izquierdo, se realizó una incisión en la línea que conecta el canto lateral de dicho ojo y el canal auditivo externo de ese mismo lado, exponiéndose de esta forma el músculo temporal. Con ayuda de una lupa binocular (Nikon SMZ-1; Nikon Corporation, Tokio, Japan), una vez retirado dicho músculo, se realizó una trepanación del cráneo con ayuda de un microtorno (Drill Freedom H00, Stoelting, Wood Dale, IL, U.S.A.), para dejar expuesto el cerebro. Después de retirar las meninges con ayuda de un gancho (Sinskey Lens Manip Hook 0.15; World Precision Instruments; U.S.A.) y de un micromanipulador (WPI M3301; World Precision Instruments, U.K.), se levantó la MCA unos milímetros, quedando ocluida su luz durante 10 minutos. Durante este intervalo de tiempo, se aplicó sobre la zona una solución salina estéril al 0.9%, para evitar que se secase. Transcurrido este tiempo, se retiró el gancho de la MCA y el clip de la CCA, procediéndose entonces a la sutura y desinfección con solución yodada de ambas incisiones (Figura 3.1).

Como animales SHAM se han utilizado animales en los que ambos vasos fueron aislados pero no ocluidos, y se han utilizado como controles.

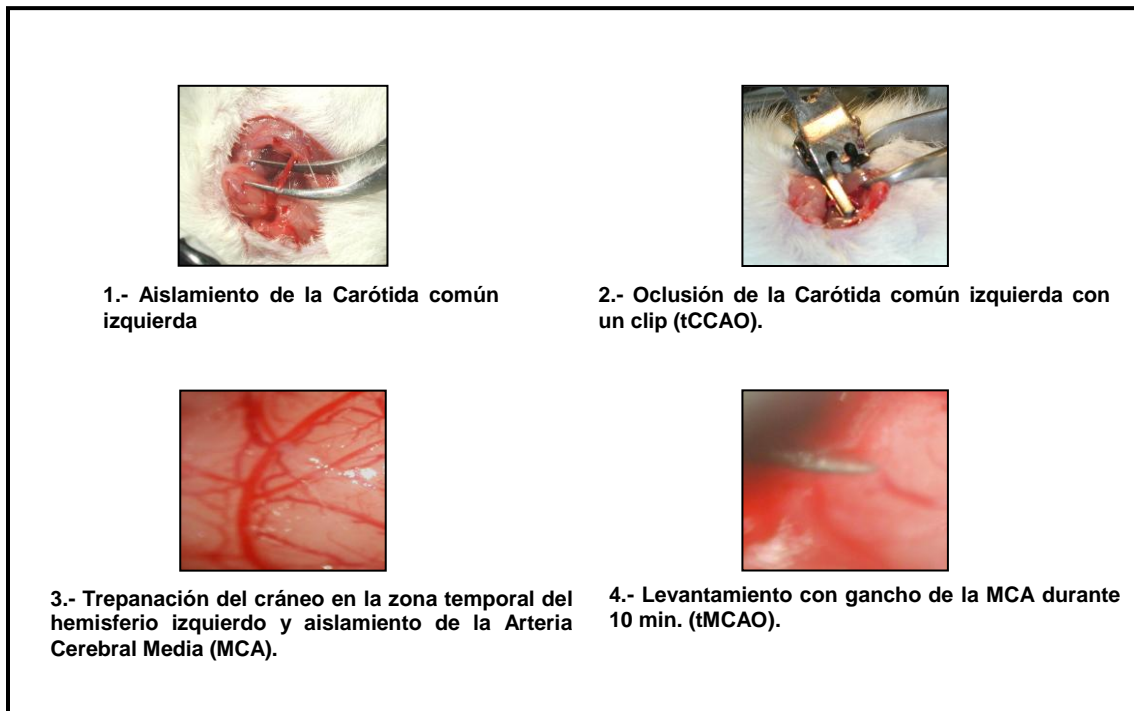


Figura 3.1: Modelo de Precondicionamiento isquémico cerebral focal (Barone et al., 1998; Cárdenas et al., 2002)

3.2.3. MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

El modelo de isquemia cerebral focal empleado en esta tesis doctoral fue descrito por Tamura et al., en el año 1981 y se perfeccionó después (Bederson et al., 1986b; Brint et al., 1988) hasta ser uno de los modelos más empleados para estudiar enfermedades cerebrovasculares y es el modelo de rutina en nuestro grupo de trabajo (De Cristobal et al., 2001). Consiste en la oclusión permanente de la CCA y de la MCA (pMCAO) izquierdas. Este modelo se ha utilizado para evaluar la capacidad del PCI (mediante la tMCAO) de producir tolerancia isquémica cerebral (TI). Para ello 48h después del PCI o del procedimiento SHAM se realizó dicha operación que consiste:

- 1) Oclusión permanente de la CCA: Tras rasurar y desinfectar con solución yodada la zona media ventral del cuello del animal, se realizó una incisión aislando de esta forma dicha arteria. Una vez hecho esto, se ocluyó la luz de la CCA mediante una ligadura con doble nudo, empleando hilo de sutura de seda de 3/0. Finalmente se cerró la incisión y se desinfectó la herida.

- 2) Oclusión permanente de la MCA: La manera de proceder para este fin es igual que para la oclusión transitoria de dicha arteria (ver apartado anterior). La única diferencia es que, una vez que la MCA está levantada con ayuda del gancho y del micromanipulador, se llena la zona con suero salino estéril al 0.9% y se ocluye la luz de la arteria con ayuda de un electrocoagulador (Geiger Model-100, Stoelting). Una vez finalizado el proceso, se cierra la incisión y se desinfecta la herida con solución yodada.

Por tanto el protocolo seguido en esta tesis doctoral ha sido el que aparece a continuación (figura 3.2):

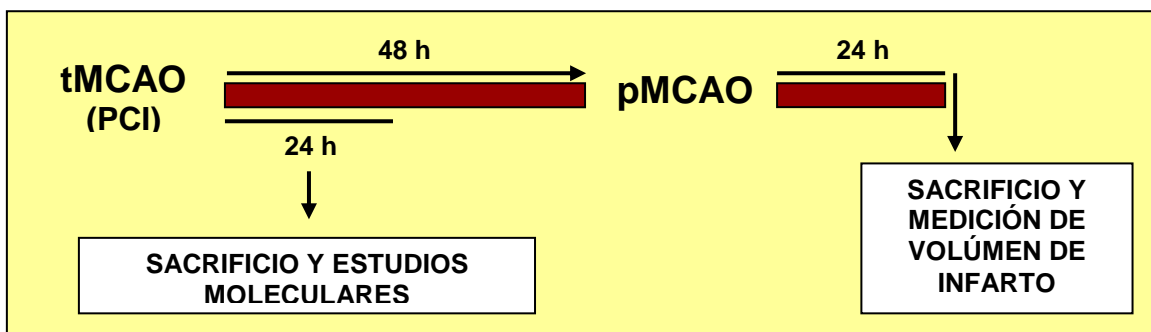


Figura 3.2: Protocolos experimentales seguidos en esta tesis doctoral en los experimentos realizados en rata.

3.3. ADMINISTRACIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE DIFERENTES HERRAMIENTAS FARMACOLÓGICAS

3.3.1. INYECCIÓN INTRACEREBROVENTRICULAR

La inyección intracerebroventricular (ICV) se ha utilizado en esta tesis doctoral para la administración de diferentes compuestos. En primer lugar y con el propósito de neutralizar el TNF- α producido por TACE tras el PCI, a un grupo de animales se les administró un anticuerpo anti-TNF- α de rata. La administración de este anticuerpo se comenzó 12 h después del PCI, recibiendo cada animal una dosis cada 2h 30 min hasta las 24 horas después de la operación. El patrón de administración de este anticuerpo se inició 12 h después del PCI, basándonos en trabajos previos de nuestro grupo en el que se observó un aumento significativo de TNF- α a este tiempo, siendo máximo a

24h. Cada dosis constaba de $10\mu\text{g}\approx 60\text{pmol}$ de este anticuerpo diluidos en $5\mu\text{l}$ de suero salino estéril inyectados a una velocidad de $2\mu\text{l}/\text{min}$ (Cárdenas et al., 2002).

En segundo lugar, para bloquear la expresión de TNFR1, se administró por esta vía un oligodesoxinucleótido antisentido para dicho receptor (ODN antisentido). La secuencia de este oligo es: 5' –ACACGGTGTCTGTTTCTCC-3', y tiene la capacidad de unirse directamente a una única secuencia del TNFR1 de rata. Además de este oligo, se administró otro que denominamos “Mismatch”, cuya secuencia es la siguiente: 5'–ACCCGTTGTTCCGGTTGCTCC-3'. Dicha secuencia es la misma que para el ODN antisentido, con la única diferencia de que posee cuatro bases desapareadas y no inhibe la expresión de este receptor (Parada et al., 2003). Según la búsqueda realizada en dos bancos de genes (EMBL y NCBI), en el TNFR1 de *Rattus norvegicus* no existe más que una secuencia homóloga frente a las empleadas en estos experimentos (Parada et al., 2003). Antes de su utilización, los ODNs liofilizados se reconstituyeron en suero salino estéril al 0.9% libre de nucleasas, a una concentración de $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$. A los animales les fue administrada por vía intracerebroventricular una dosis/día de $40\mu\text{g}$ de ODN antisentido o de “mismatch” en un volumen de $4\mu\text{l}$ e inyectados a una velocidad de $2\mu\text{l}/\text{min}$. Los animales del grupo al que se le midió el volumen de infarto recibieron tres dosis de antisentido o de “mismatch”, una 24h antes del PCI, otra inmediatamente después de realizar la operación y la última 24h después de la misma. 48h después del PCI (24 h después de la última inyección) se les realizó la pMCAO, midiendo el volumen de infarto 24h después de esta última operación y según el protocolo descrito más adelante. Los animales en los que se iba a determinar los niveles de expresión proteica (ver apartado de determinaciones moleculares), únicamente recibieron dos inyecciones de estos oligodesoxinucleótidos, una 24h antes del PCI y la última justo después de dicha maniobra, sacrificándolos 24h después del PCI, obteniéndose entonces las muestras cerebrales correspondientes para realizar dichas determinaciones proteicas.

Por último, mediante esta vía de administración (ICV) también se administró un inhibidor específico del proteasoma, lactacistina. Este es un

compuesto microbiano que destaca por su alta especificidad de inhibición del proteasoma 20S (para revisión ver (Fenteany y Schreiber, 1998), y se ha utilizado en esta tesis doctoral para impedir la activación de NF- κ B. En concreto se ha empleado para impedir la degradación por parte del proteasoma de I κ B y la consecuente traslocación al núcleo de este factor de transcripción (Grisham et al., 1999). Lactacistina se ha administrado a una concentración de 100 μ M, en un volumen de 4 μ l inyectados a una velocidad de 2 μ l/min. El patrón de administración fue de 1 dosis cada 8h (3 dosis al día, a las 8:00h am., 16:00 pm., y 24:00h pm; Fornai et al., 2003). Los animales en los que se determinó el volumen de infarto recibieron 7 inyecciones de lactacistina, empezando con la primera justo después de realizar el PCI (8:00h am), y continuando con la administración cada 8 horas hasta la realización de la pMCAO (48h después del PCI). 24h después de esta segunda operación, los animales fueron sacrificados, midiendo entonces el volumen de infarto según se describe más adelante. Los animales en los que se iba a determinar los niveles de expresión proteica únicamente recibieron 4 dosis de este compuesto, empezando con la administración de la primera justo después del PCI y continuando hasta 24h después de dicha operación. Fue entonces cuando se procedió a su sacrificio, recogiendo las muestras cerebrales correspondientes.

A los animales en los que se iba a llevar a cabo la inyección intracerebroventricular, con ayuda de anestesia (2% de Halotano en una mezcla al 70% de óxido nitroso y 30% de oxígeno) se les insertó una cánula de calibre 26 (Plastics One, Roanoke, VA) dentro del ventrículo izquierdo. Esta inserción se realizó con ayuda de un aparato esterotáxico (Davis Kopf Instruments, Tujunga, Canadá) tomando como referencia a bregma, en las coordenadas siguientes: anteroposterior, -0.8mm; lateral, 1.0mm; dorsoventral, 3.6mm. Una vez colocada la cánula, se implantaron unos tornillos de acero inoxidable que, con la ayuda de cemento dental, permitieron la fijación de dichas cánulas al cráneo (Cárdenas et al., 2002). Tras 5 días de recuperación, se les realizó el PCI o el PCI más pMCAO según se ha descrito anteriormente. Cada administración por ICV se realizó en el animal sin anestesia y con ayuda de una cánula de inyección de calibre 33 que presenta la característica de tener 1mm más de largo que la cánula guía. Dicha cánula iba conectada a una

bomba de perfusión (HA 22; Harvard Apparatus, Holliston, MA, U.S.A.), permitiendo de esta forma administrar cada inyección a una velocidad determinada (2 μ l/min.).

3.3.2 ADMINISTRACIÓN SUBCUTÁNEA

Mediante esta vía se administró el compuesto BB1101 (2S-alil-N¹-hidroxi-3R-isobutil-N⁴-(1S-metilcarbamoil-2-feniletil)-succinamida). Este compuesto es un derivado del ácido hidroxámico y se ha empleado porque es capaz de inhibir de forma potente la actividad de la enzima convertidora de TNF- α (TACE/ADAM17). Esta capacidad de inhibición sobre TACE es: IC₅₀ \approx 0.05-0.1 μ M, mientras que en el caso de otras proteínas como ADAM10 o α -secretasa es IC₅₀ \approx 3-20 μ M (Parvathy et al., 1998; Hooper et al., 2000). De hecho BB1101 se ha empleado como inhibidor específico de metaloproteasas con capacidad de corte (Ancuta et al., 1997; Middelhoven et al., 1997; Fiorucci et al., 1998; Lammich et al., 1999). Este compuesto se administró a una dosis de 10mg/kg/día, siguiendo resultados previos de nuestro grupo que demostraban una inhibición efectiva de TACE (Cárdenas et al., 2002; Madrigal et al., 2002). Para conseguir una inhibición eficiente de TACE, los animales tratados con este compuesto recibieron dos dosis, una nada más realizar el PCI y otra a las 24 horas, siendo sacrificados 48h después de dicha isquemia transitoria (Cárdenas et al., 2002). Debido a la baja hidrosolubilidad de este compuesto y siguiendo las instrucciones del fabricante, se disolvió en suero salino y se sometió a 20 minutos de sonicación, tras los cuales fue suministrado a los animales para evitar su precipitación.

3.4. GRUPOS EXPERIMENTALES (RATA)

3.4.1. GRUPOS EXPERIMENTALES PARA LOS ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA (Figura 3.3)

Para la determinación de la expresión de diferentes proteínas (TACE, TNFR1 y 2, la subunidad p65 de NF- κ B y los diferentes transportadores de

glutamato) se utilizaron los siguientes grupos experimentales: a) Ratas Sham, utilizadas como grupo control (SHAM); b) Animales con tMCAO, como grupo PCI; c) tMCAO + BB1101 (inhibidor selectivo de la actividad TACE; PCI + BB); d) tMCAO + ODN antisentido para TNFR1 (PCI + antisentido); e) tMCAO + ODN mismatch para TNFR1 (PCI + mismatch); f) tMCAO + Lactacistina (inhibidor específico del proteasoma; PCI + lactacistina) y g) tMCAO + anti TNF- α (PCI + anti-TNF- α). En estos experimentos para la determinación de la expresión proteica se emplearon 6 animales por grupo. El mismo número de animales por grupo se utilizó para los estudios de traslocación al núcleo de NF- κ B.

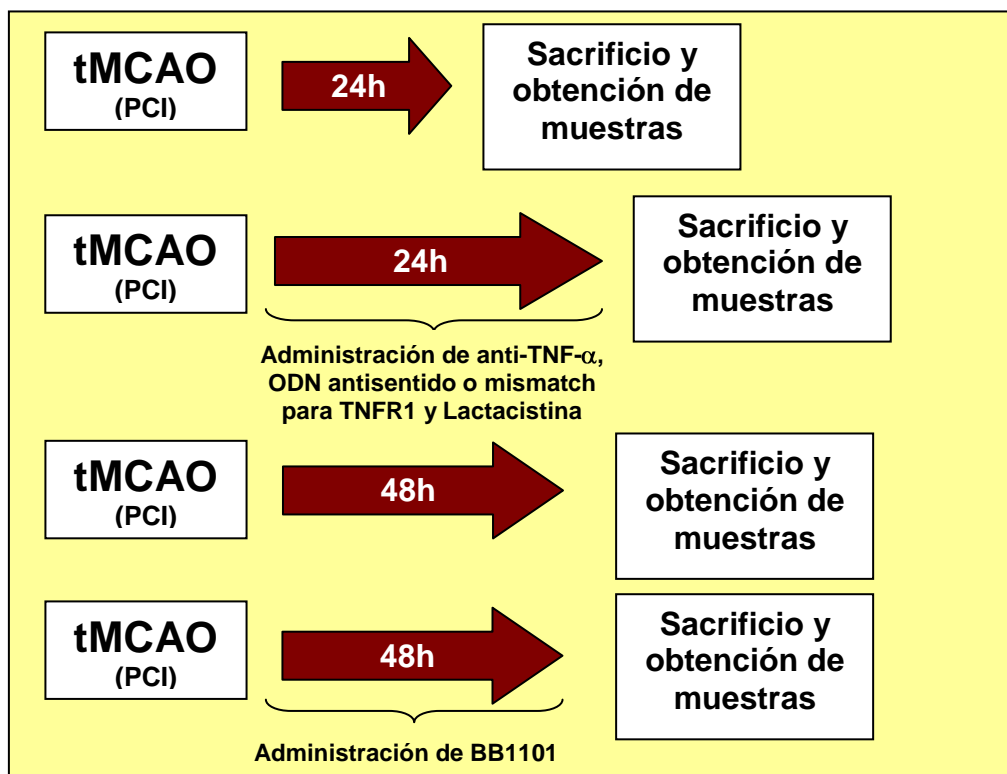


Figura 3.3: Grupos experimentales diseñados para los estudios moleculares.

3.4.2. GRUPOS EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL (Figura 3.4)

Para evaluar la capacidad del PCI de producir TI, 48h después de esta operación o del procedimiento Sham se realizó la oclusión permanente de la MCA, midiendo el volumen de infarto 24h después. Para estos experimentos se diseñaron 8 nuevos grupos experimentales: a) SHAM+pMCAO (n=8); b) PCI+pMCAO (n=8); c) PCI+BB+pMCAO (n=8); d) PCI+anti-TNF- α +pMCAO (n=6); e) PCI+antisentido TNFR1+pMCAO (n=6); f) PCI+mismatch TNFR1+pMCAO (n=6); g) SHAM+lactacistina+pMCAO (n=6) y h) PCI+lactacistina+pMCAO (n=6).

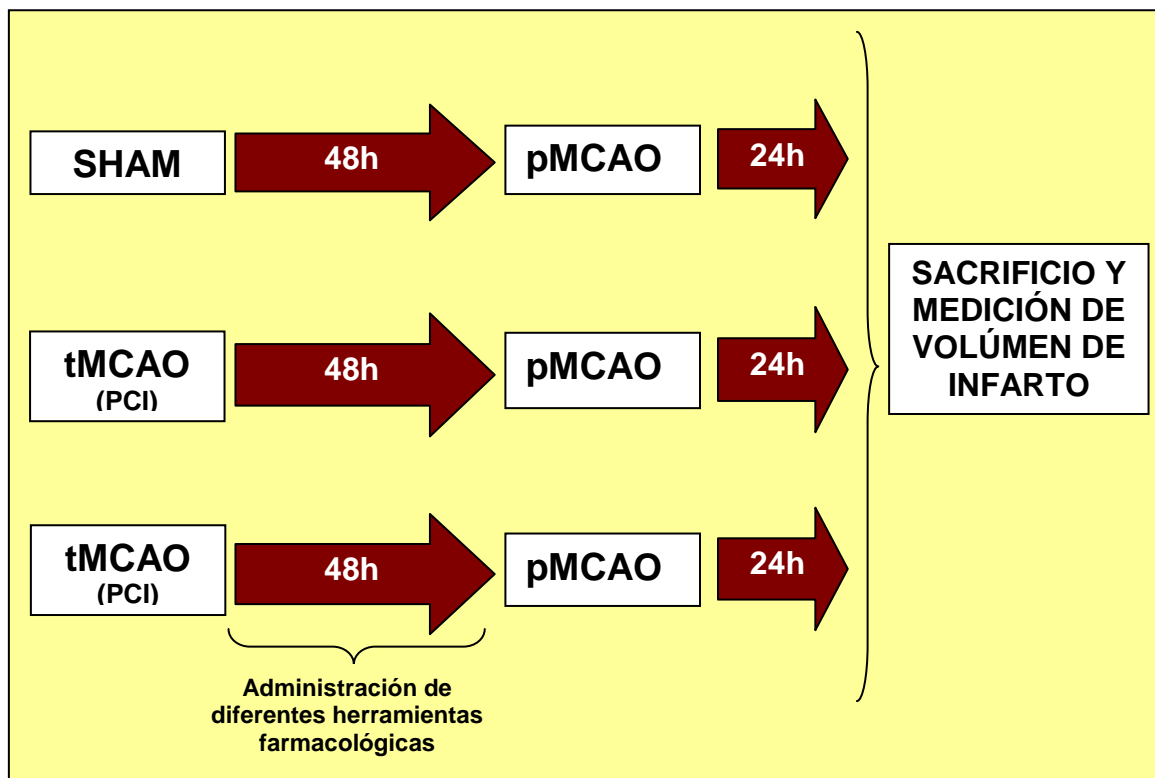


Figura 3.4: Grupos experimentales empleados para estudiar la TI producida por el PCI y estudiar el efecto de diferentes herramientas farmacológicas sobre dicha TI.

Por último, para analizar la localización celular de TACE, TNFR1 y EAAT3 se realizaron experimentos de inmunohistoquímica en animales sacrificados 24h después del procedimiento SHAM, después del PCI o después del PCI+ administración de diferentes compuestos (BB1101, anti-TNF- α , antisentido o mismatch de TNFR1). En estos experimentos, el número de animales por

grupo fue de 2 y las técnicas de inmunohistoquímica se repitieron 3 veces (ver figura 3.5).

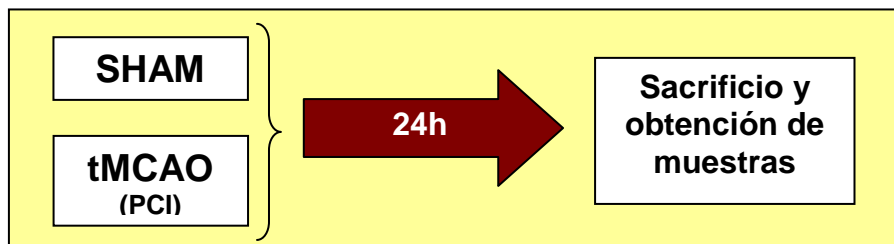


Figura 3.5: Grupos experimentales utilizados para estudiar la localización celular de TACE, TNFR1 y EAAT3 mediante experimentos de inmunohistoquímica.

3.5. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO Y CARACTERIZACIÓN NEUROLÓGICA

3.5.1. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO

Veinticuatro horas después de la pMCAO, se sacrificó a los animales mediante sobredosis de pentobarbital, extrayéndose entonces los cerebros. Con ayuda de una matriz para cerebro de rata (Brain Matrix; WPI) se realizaron cortes coronales de los mismos de 2mm de grosor y se sumergieron en una solución de cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (TTC, Merk) al 2% p/v en tampón fosfato 0.1M durante 10 minutos a 37°C. El TTC es una sal de tetrazolio que tiene la capacidad de ser reducido por la cadena respiratoria mitocondrial de forma que cambia de incoloro a rojo (Bederson et al., 1986a). La zona infartada, al carecer de actividad mitocondrial debido a la muerte celular, no podrá reducir este compuesto y presentará coloración blanca.

Una vez teñidos los cortes, se fotografiaron por ambos lados con una cámara digital (Nikon CoolPix990. Nikon Corporation, Tokio, Japón). Tomadas todas las fotografías, se calculó el volumen de infarto con ayuda de un programa informático de análisis de imagen (Scion Image para Windows 2000, Scion Corporation, Frederick, MD). Para realizar esta medida, se expuso en el monitor la imagen digitalizada de cada corte y para evitar el error procedente del observador y descartar el edema, se midió el área del hemisferio contralateral para después superponerlo sobre el ipsilateral. Con ayuda del

cursor se marcó el área infartada que comprendía el córtex, subcórtex y estriado, expresándola en milímetros cuadrados. Para obtener el volumen de infarto (expresado en mm^3) se integraron todas las áreas infartadas sobre la extensión del infarto calculado como una proyección ortogonal.

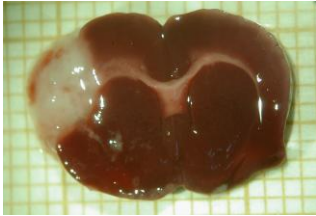


Figura 3.5.1: Fotografía digital de una sección coronal de cerebro de rata teñida con TTC para la cuantificación del volumen de infarto

3.5.2. CARACTERIZACIÓN NEUROLÓGICA DESPUÉS DE pMCAO

Previo al sacrificio de los animales, se realizó un test comportamental previamente establecido (Hunter et al., 2000) para evaluar los posibles déficits neurológicos de los mismos tras la pMCAO. De acuerdo con este test, los síntomas evaluados junto con su puntuación, fueron los siguientes:

- 0 puntos.- Sin déficits aparentes.
- 1 punto.- Flexión del miembro anterior contralateral.
- 2 puntos.- Disminución de la fuerza de agarre del miembro anterior contralateral.
- 3 puntos.- Movimiento circular contralateral cuando se sujeta al animal por la cola.
- 4 puntos.- Movimiento circular contralateral espontáneo.
- 5 puntos.- No respuesta ante cualquier estimulación (coma).

Como vemos, por la puntuación asignada a cada déficit motor, a mayor puntuación peor estado neurológico. Estos análisis se realizaron 3 veces para cada animal y por otro experimentador diferente al que realizó las operaciones y, la puntuación final para cada grupo experimental, se calculó multiplicando el número de animales que presentan cada déficit motor por los puntos asignados para cada uno y dividido por el total de animales por grupo, siendo el nivel de significación de $p < 0.05$.

3.6. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS DE CEREBRO

Para la determinación de los niveles de expresión de determinadas proteínas, los animales fueron sacrificados, mediante sobredosis de pentobarbital sódico, 24 y 48h después del PCI (ver figura 3.3). Del cerebro completo se seleccionaron las áreas que rodean la zona preconditionada, y de éstas únicamente se tomó la corteza. Después, ésta se homogeneizó mediante sonicación durante 10 segundos a 4°C en cuatro volúmenes de tampón de homogeneización cuya composición era: 320 mM de sacarosa, 1mM de DL-ditiotreitol, 10µg/ml de inhibidor de tripsina, 10µg/ml de leupeptina, 2µg/ml de aprotinina, 0.2% v/v de Nonidet P40TM (Roche, Barcelona, España) y 50 mM de Tris Base, ajustándose el pH con HCl a 20°C a pH 7.4.

Una vez procesadas todas las muestras, se calculó la cantidad de proteína de cada una de ellas mediante dos métodos:

- Método del Ácido Bicinconínico: Está basado en la capacidad de las proteínas de reducir en medio alcalino el Cu (II) a Cu (I) de forma concentración dependiente ((Hill and Straka, 1988)) y la formación de un complejo ácido bicinconínico:Cu(I) de color violeta, que podemos registrar a una longitud de onda de 562 nm. En cada tubo se mezcló: la muestra diluida 10 veces más 1ml del reactivo cromógeno (98% v/v de ácido bicinconínico y 2% de sulfato de cobre). Esto se mantuvo 30 minutos a 60°C midiéndose después a 562nm. Como estándar se emplea albúmina de suero bovina (BSA).
- Método de Bradford: Es un método muy sensible y rápido. Consiste en la formación de un compuesto que interacciona con los aminoácidos básicos de las proteínas y al producirse esto absorbe en el azul. Este compuesto es un colorante, el Azul de Coomassie, el cual cuando no está unido a las proteínas, presenta color rojo y una absorción a 465nm. Cuando se une a las proteínas cambia de color, a azul, cambiando también su máximo de absorción a 595nm. Se prepara una curva patrón con BSA. Las muestras, tras diluirlas 80 veces, para que la concentración de proteína entre dentro del rango de la curva patrón, se mezclaron con el reactivo de Bradford, que

contiene este colorante (10 μ l de la muestra diluida + 200 μ l del reactivo). Tras esperar 5 minutos se midió la cantidad de proteína a 595nm.

Una vez finalizado el procesamiento, se congelaron los tubos a -80°C, hasta su utilización.

Para la determinación de la activación de NF- κ B (presencia de p65 en el núcleo celular) se aislaron los extractos nucleares siguiendo un protocolo utilizado ya en nuestro grupo de trabajo (Cárdenas et al., 2002)). El tejido cerebral (corteza cerebral ipsilateral) se homogenizó en 300 μ l de tampón A cuya composición es: 10mM de HEPES, pH 7.9; 1mM de EGTA, 10mM de KCl, 1mM de DTT, 0.5 mM de PMSF, 0.1 μ g/ml de aprotinina, 1 μ g/ml de leupeptina, 1 μ g/ml de NaF, 1mM NaVO₄, 0.5 mM de sacarosa y 10mM Na₂MoO₄). Pasados 15 minutos, a la mezcla anterior se le añadió Nonidet P-40 hasta alcanzar una concentración del 0.5%. Entonces los tubos se agitaron en vórtex durante 15 segundos, separando la fracción citosólica de la nuclear mediante centrifugación a 8.000 x g durante 5 minutos. Los pellets (que se corresponden con la fracción nuclear) se resuspendieron en 100 μ l de tampón A suplementado con 20% de glicerol y 0.4 M de KCl, manteniéndose en agitación durante 30 minutos a 4°C. Los extractos de proteínas nucleares se obtuvieron finalmente mediante centrifugación a 13.000 x g durante 5 minutos. Después se recogió el sobrenadante y se midió la cantidad de proteína que contenía cada muestra por los métodos descritos anteriormente. Una vez hecho esto, se congelaron los tubos a -80°C.

Es importante destacar que todo el proceso de extracción de las muestras cerebrales y todo el procesamiento de las mismas se realizó a 4°C.

3.7. DETERMINACIONES MOLECULARES

3.7.1. DETERMINACIONES MOLECULARES POR WESTERN BLOT

Mediante la técnica de Western blot se analizó la expresión proteica de los receptores de TNF- α (TNFR1 y 2), de la subunidad p65 de NF- κ B en núcleo

y de los transportadores de glutamato (EAAT1/GLAST, EAAT2/GLT-1 y EAAT3/EAAC1) en homogeneizados de corteza ipsilateral 24 y 48 horas después del PCI o del procedimiento sham. Para ello, las muestras que contenían 20µg de proteína, se separaron mediante electroforesis en un gel al 10-12% p/v de poliacrilamida-SDS a 90mA. Una vez separadas, se transfirieron del gel a una membrana PVDF (HybondTM-P, Amersham Biosciences, Europe GMBH, Friburg, Alemania) mediante electrotransferencia. Ya en la membrana, se incubaron con anticuerpos primarios específicos contra TNFR1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, California, USA; 1:500), TNFR2 (Santa Cruz; 1:250), p65 (Santa Cruz; 1:1000), EAAT1/GLAST (Santa Cruz; 1:500), EAAT2/GLT-1 (Santa Cruz; 1:500) y EAAT3/EAAC1 (Santa Cruz; 1:500). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos que reconocían IgG de ratón, conejo o cabra, unidos a peroxidasa (Amersham). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se revelaron utilizando un kit de ECL (Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados que se reflejan más adelante provienen de 6-8 repeticiones de este proceso, y están expresados como la absorbancia relativa obtenida mediante análisis por densitometría. Como control de carga se utilizó β -actina para los experimentos de TNFR1, TNFR2 y transportadores de glutamato, y Sp1 para los de p65.

3.7.2 DETERMINACIONES MOLECULARES MEDIANTE INMUNOFLUORESCENCIA

Veinticuatro horas después del procedimiento SHAM o del PCI (ver apartado de inmunohistoquímica dentro de los grupos experimentales) los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico y perfundidos a través del ventrículo derecho del corazón con 200 ml de tampón fosfato sódico 0.2 M (PBS), pH 7.4, utilizado como solución de lavado. Después se les perfundió con 300 ml de una solución fijadora de paraformaldehído al 4% p/v en PBS 0.2 M a temperatura ambiente. Una vez hecho esto, los cerebros se introdujeron primero en la misma solución de fijación durante 4 horas a temperatura ambiente, después se mantuvieron varios días a 4°C en una solución crioprotectora que contenía 30% p/v de sacarosa en PBS 0.1 M, procediéndose entonces a su congelación. De cada uno se obtuvieron una serie de cortes de

8µm de la parte frontal del cerebro, mediante el empleo de un microtomo (Microtome Cryostat HM500OM, Microm Internacional). Una vez hechos los cortes, se permeabilizaron primero en acetona durante 10 minutos a 4°C, y luego, tras dejar evaporar el exceso de acetona, en una solución de Tritón-X-100 al 0.1% V/V en PBS 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se introdujeron en otra solución para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos que se iban a emplear, compuesta por BSA al 3% p/v en PBS 1x durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, cada preparación se incubó con los anticuerpos primarios correspondientes para esta doble inmunotinción, uno contra la proteína que se quería determinar y otro contra una proteína específica de cada tipo celular a estudiar. Esta incubación se realizó durante toda la noche a 4°C y en cámara húmeda y los anticuerpos empleados fueron: anticuerpo policlonal anti-TACE (ProSci Inc., Poway, CA; dilución 1:10), anticuerpo policlonal anti-TNFR1 (Santa Cruz; dilución 1:10) y anticuerpo policlonal anti-EAAT3/EAAC1 (Santa Cruz; 1:10). Para el marcaje celular se utilizaron junto con los anticuerpos antes citados un anticuerpo NeuN (para el marcaje de neuronas; Chemicon; dilución 1:10), un anticuerpo contra la proteína fibrilar de la glía (GFAP, Chemicon, dilución 1:10) y lectina de tomate marcada con fluoresceína (aglutinina procedente de *Lycopersicon esculentum*; Sigma, dilución 1:150), para el marcaje de microglía y macrófagos ((Acarin et al., 1994)). Después de lavar las secciones en PBS 1x, se incubaron con anticuerpos secundarios durante 1 hora en cámara húmeda a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario empleado para marcar TACE, TNFR1 y EAAT3 fue una inmunoglobulina de cabra contra IgG de conejo (Cy3TM, Amersham; dilución 1:10; color rojo con un máximo de fluorescencia a 670 nm); y el secundario para el marcaje de NeuN y GFAP fue otra inmunoglobulina hecha también en cabra contra IgG de ratón (Cy2TM, Amersham; dilución 1:10, con color verde y un máximo de fluorescencia a 506 nm). Después de varios lavados en PBS para eliminar el exceso de anticuerpo, se montaron las preparaciones y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse TE300, Nikon Corporation, Tokio, Japón) utilizando los objetivos de 20x/0.45 o 40x/0.6 y fase óptica, un filtro B2A Nikon para ver la fluorescencia de la fluoresceína de la Lectina de tomate (FITC) y de Cy2 o un filtro G2A Nikon para la fluorescencia de Cy3. Las áreas

seleccionadas corresponden a las regiones adyacentes a la zona donde se realizó la oclusión transitoria de MCA, incluyéndose en estas zonas tanto córtex como estriado. Cada experimento se realizó por duplicado y se repitió tres veces. La adquisición de imágenes se hizo gracias a un sistema de imagen confocal (MRC1024, Biorad, Hempstead, Gran Bretaña).

BLOQUE II

3.8. MODELOS EXPERIMENTALES DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO E ISQUEMIA CEREBRALES EN RATÓN

3.8.1. MODELO DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CEREBRAL GLOBAL

El modelo de PCI empleado para los experimentos de tolerancia isquémica en ratón fue descrito por Wu y colaboradores en 2001. En este modelo se realiza una isquemia global transitoria, mediante el aislamiento de las dos arterias carótidas comunes y su oclusión transitoria durante 6 minutos con el empleo de dos clips. Los animales se anestesiaron con isoflurano al 2% en una mezcla de Nitrógeno (70%) y Oxígeno (30%) y la temperatura corporal se mantuvo a 37°C durante toda la operación mediante el empleo de una manta térmica (LSI LETICA, HB 101/2; Panlab S.L., Cornellà, España). Tras rasurar y desinfectar la zona ventral del cuello, se realizó una incisión de aproximadamente 1cm, aislando entonces ambas carótidas. Como se ha citado antes, ambas arterias se ocluyeron con la ayuda de dos clips. Los tiempos ensayados para esta oclusión transitoria, al igual que en lo descrito por Wu y colaboradores, fueron de 4, 6 y 8 minutos. Teniendo en cuenta el porcentaje de disminución del volumen de infarto y la mortalidad de los animales (ver el apartado correspondiente dentro de los resultados), se concretó el tiempo de oclusión transitoria. Este tiempo, y coincidiendo de nuevo con los resultados previos existentes en la bibliografía (Wu et al., 2001), fue de 6 minutos, tras los cuales se retiraron los clips, procediendo entonces a la sutura y desinfección de la incisión con solución yodada. En ambas estirpes de ratón, C57BL/ScSn y

ScNJ, y en un grupo de animales, se aislaron y no se ocluyeron ambas carótidas, denominándose a este grupo SHAM, grupo empleado como control.

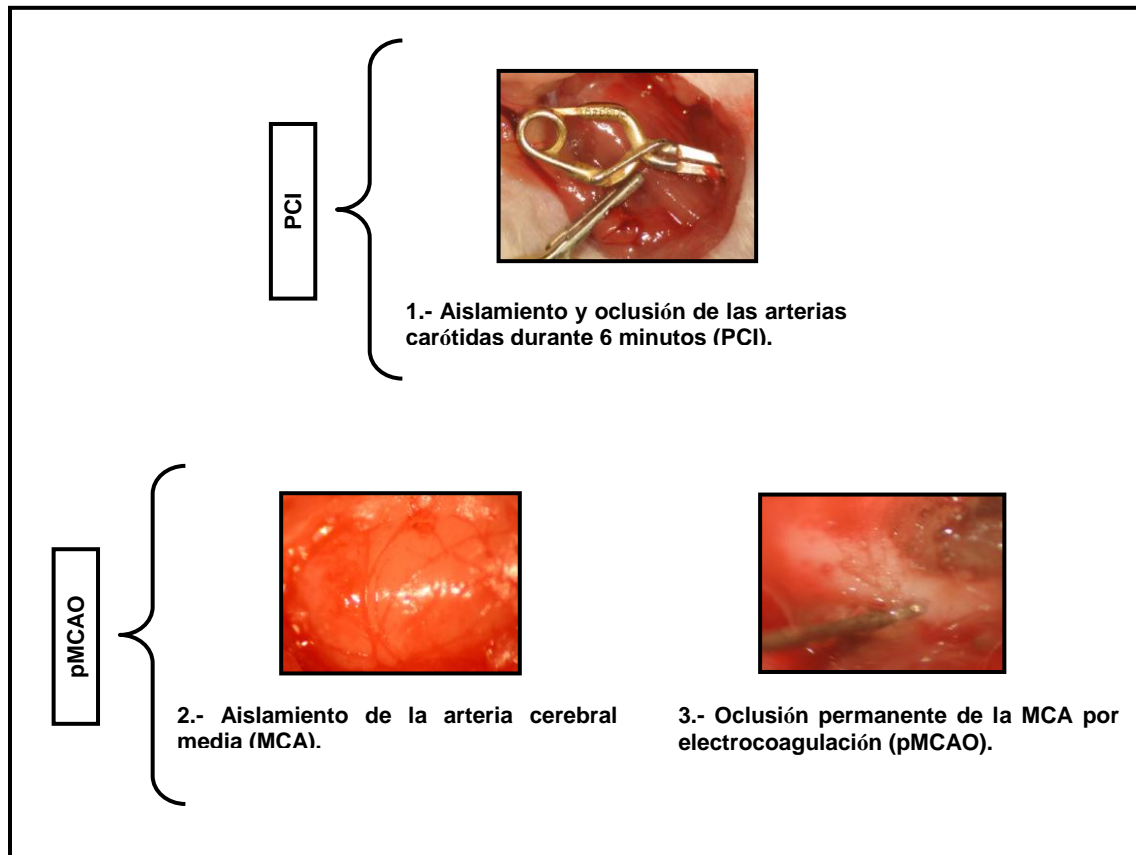


Figura 3.8.1: Modelo de preconditionamiento isquémico cerebral global (Wu et al., 2001) e ischemia focal permanente (Lambertsen et al., 2005) en ratón.

3.8.2. MODELO DE ISQUEMIA CEREBRAL FOCAL

El modelo de isquemia cerebral focal realizado en ratón, se ha utilizado en nuestro laboratorio en trabajos previos (Caso et al., 2007) y fue descrito por Lambertsen et al (2005). Como se observa en la figura anterior, este modelo consiste en el aislamiento de la arteria cerebral media izquierda (MCA) y su oclusión de forma permanente mediante electrocoagulación. A diferencia del modelo de rata, la oclusión de la arteria carótida en ratón no es necesaria y su realización aumenta mucho la mortalidad de los animales. Esta isquemia permanente se ha utilizado para valorar la capacidad del PCI de producir TI. Para ello, en ambas estirpes de ratón (C57BL/ScSn y ScNJ) 48 horas después

del PCI o del procedimiento SHAM, se realizó esta isquemia permanente. La manipulación de los animales durante la operación, durante el aislamiento y electrocoagulación de la MCAO, se realizó de la misma manera que para rata (ver apartado 3.2.3).

Es importante resaltar que es la primera vez en la que se combinan el modelo de Wu de PCI y este modelo de isquemia focal permanente descrito por Lambertsen, para el estudio del desarrollo de la TI.

Por tanto el protocolo seguido en esta tesis doctoral para los experimentos realizados en ratón, ha sido el que aparece a continuación:

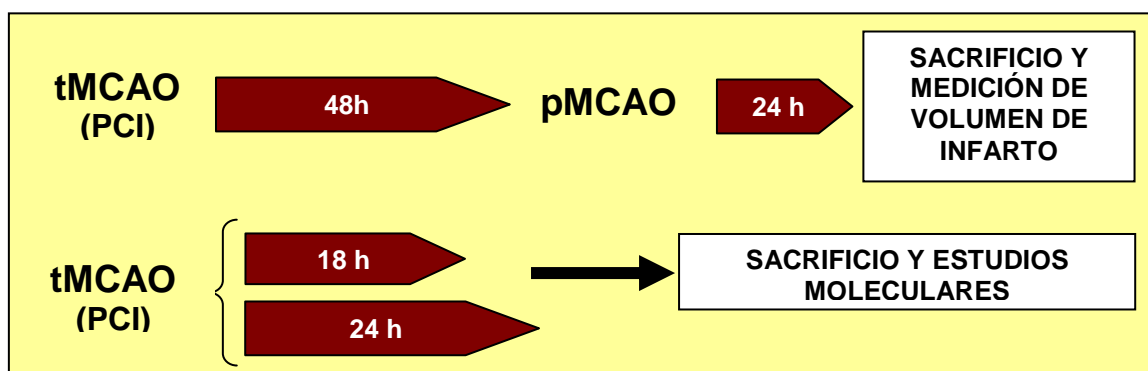


Figura 3.8.2: Protocolos experimentales seguidos en esta tesis doctoral en los experimentos realizados en ratón.

3.9. GRUPOS EXPERIMENTALES (RATÓN)

3.9.1. GRUPOS EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL

Para evaluar la capacidad del PCI de producir TI, 48h después de esta operación o del procedimiento sham se realizó la oclusión permanente de la MCA, midiendo el volumen de infarto y diferentes déficits motores 24h después de esta pMCAO. Los siguientes grupos experimentales diseñados para estos experimentos y para ambas estirpes de ratón, fueron: a) SHAM+pMCAO ScSn (n=8); b) PCI+pMCAO ScSn (n=8); c) SHAM+pMCAO ScNJ (n=8); d) PCI+pMCAO ScNJ (n=8).

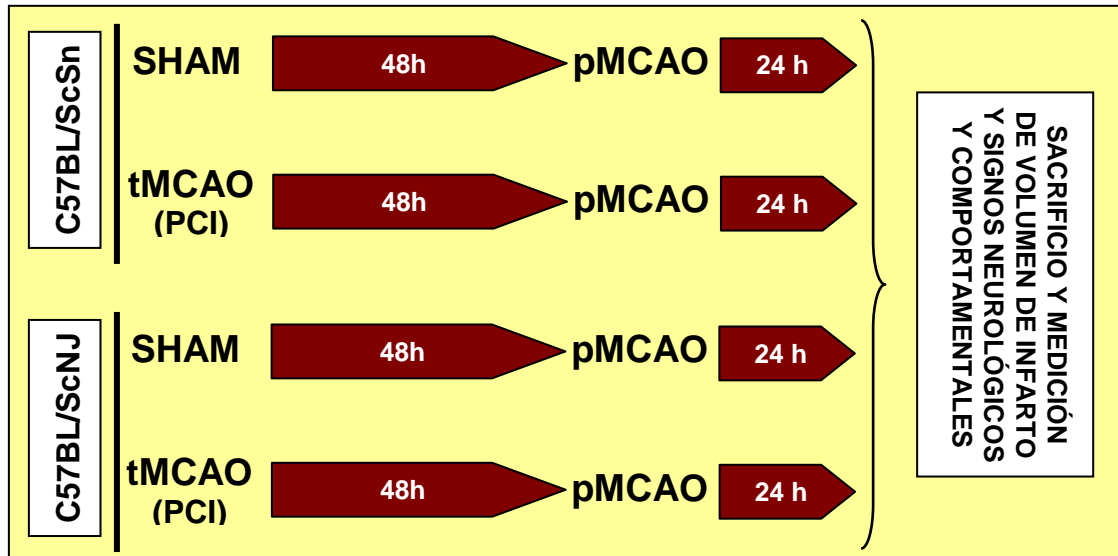


Figura 3.9.1: Grupos experimentales empleados para estudiar la TI producida por el PCI y estudiar el efecto de diferentes herramientas farmacológicas sobre dicha TI.

3.9.2. GRUPOS EXPERIMENTALES PARA LA DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

Para la determinación de la expresión de diferentes proteínas pro-inflamatorias (iNOS, COX2 y MMP9) mediante western blot, se utilizaron los siguientes grupos experimentales: a) Animales sham, utilizados como grupo control (SHAM ScSn y ScNJ); b) Animales con tMCAO, como grupo PCI (PCI ScSn y PCI ScNJ). Los animales de estos grupos fueron sacrificados 24 horas después del procedimiento sham o del PCI.

Otro grupo de animales, de ambas estirpes de ratón, se sacrificó 18 horas después del procedimiento sham o del PCI para estudiar la activación de NF- κ B. Esta activación se ha analizado observando la presencia de p65, uno de los componentes de NF- κ B, o por la desaparición de una de las proteínas que lo secuestra en el citoplasma, I κ B- α . Por tanto estos grupos experimentales fueron: a) SHAM-18h (ScSn y ScNJ); b) PCI-18h (ScSn y ScNJ).

En estos experimentos de expresión proteica se emplearon 6 animales en cada grupo experimental.

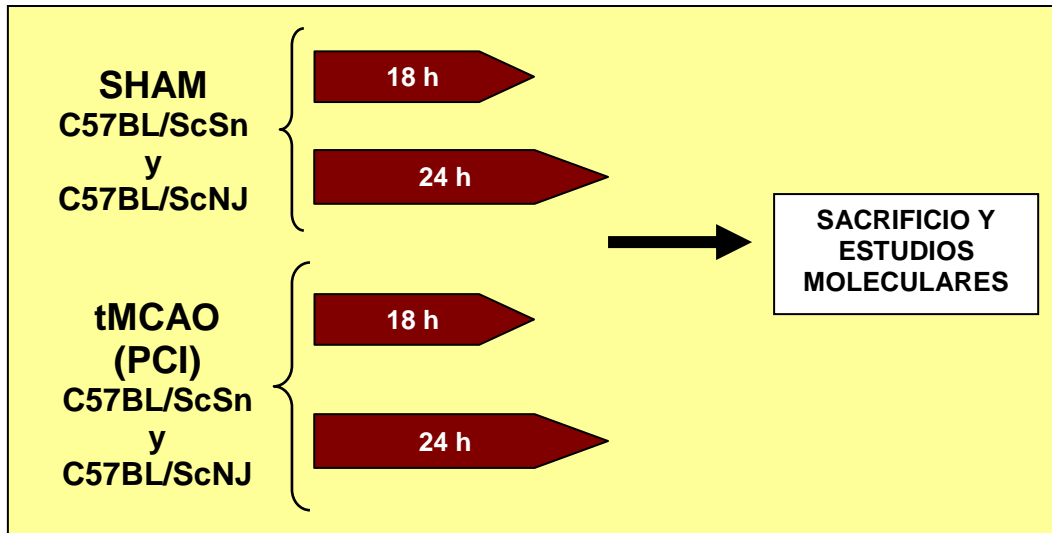


Figura 3.9.2: Grupos experimentales diseñados para los estudios moleculares.

3.10. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO, CARACTERIZACIÓN NEUROLÓGICA Y COMPORTAMENTAL

3.10.1. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE INFARTO

Veinticuatro horas después de la pMCAO, se sacrificó a los animales mediante sobredosis de pentobarbital, extrayéndose entonces los cerebros. Con ayuda de una matriz para cerebro de ratón (Brain Matrix; WPI) se realizaron cortes coronales de los mismos de 1mm de grosor tiñéndolos con TTC, siguiendo el mismo protocolo que el empleado y descrito en el bloque I (ver apartado 3.5.1; (Bederson et al., 1986a). Tras fotografiar los cortes únicamente por una de sus caras, se calculó el volumen de infarto de la misma forma que la descrita en el apartado 3.5.1. Una vez integradas todas las áreas infartadas, se obtuvo el volumen de infarto, expresado en mm³.

3.10.2. CARACTERIZACIÓN NEUROLÓGICA

Al igual que en los experimentos realizados en rata, 24 horas después de la isquemia permanente experimental se realizó un test para evaluar los déficits neurológicos (déficits motores) causados por la pMCAO en ratón desarrollado por Hunter y colaboradores (2000).

Los signos evaluados en el test neurológico junto con su puntuación fueron los siguientes:

- 0 puntos.- Sin déficits aparentes.
- 1 punto.- Flexión del miembro anterior contralateral.
- 2 puntos.- Movimiento circular contralateral cuando se sujeta al animal por la cola.
- 3 puntos.- Giro contralateral espontáneo.
- 4 puntos.- No respuesta ante cualquier estimulación (coma).

Como vemos, en este test se evaluaron diferentes déficits motores asignando a cada uno una puntuación. A mayor puntuación peor estado neurológico. Estos análisis motores se realizaron por otro experimentador diferente al que realizó las operaciones y, cada uno de los test se realizó 3 veces por animal para dar consistencia a los resultados.

3.11. OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS DE CEREBRO

Al igual que en los experimentos realizados en rata, para la determinación de los niveles de expresión de determinadas proteínas los animales fueron sacrificados, mediante sobredosis de pentobarbital sódico, 24h después del PCI (figura 3.9.2). Del cerebro se diseccionaron ambas cortezas completas, siendo éstas las muestras a procesar. Al igual que lo descrito en el apartado 3.6, las muestras se homogeneizaron por sonicación en cuatro volúmenes de tampón de homogeneización, cuya composición era igual que la empleada para los experimentos de rata.

Una vez procesadas las muestras, se calculó la cantidad de proteína de cada una de ellas mediante el método de Bradford, congelando los tubos a -80°C hasta su utilización.

Para la determinación de la activación de NF- κ B (desaparición de I κ B α del citoplasma), 18 horas después del procedimiento sham o del PCI, se aislaron los extractos citosólicos y nucleares siguiendo el protocolo descrito anteriormente y utilizado ya en nuestro grupo de trabajo (Cárdenas et al., 2002). Una vez hecho esto, se congelaron los tubos a -80°C.

Es importante destacar que todo el proceso de extracción de las muestras cerebrales y todo el procesamiento de las mismas se realizó a 4°C.

3.12. DETERMINACIONES MOLECULARES POR WESTERN BLOT

Mediante la técnica de Western blot se analizó la expresión de diferentes proteínas proinflamatorias como iNOS, COX2 y MMP9 en homogeneizados de corteza cerebral 24 horas después del PCI o del procedimiento sham. Por el contrario, en los animales sacrificados 18 horas después de los protocolos quirúrgicos, se analizó la activación de NF- κ B mediante la desaparición de I κ B α de los extractos citosólicos y también por la presencia de p65, una de las subunidades de este factor de transcripción, en extractos nucleares. Para ello las muestras que contenían 20 μ g de proteína, se separaron mediante electroforesis en un gel al 7% p/v de poliacrilamida-SDS y al 10% para COX2, I κ B α y p65, a 90mA. Una vez separadas, se transfirieron del gel a una membrana PVDF. Ya en la membrana, se incubaron con anticuerpos primarios específicos contra iNOS (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, California, USA; 1:1000), COX2 (Santa Cruz; 1:1000), MMP9 (Chemicon Internacional; 1:1000), I κ B α (Santa Cruz; 1:500) y p65 (Santa Cruz; 1:500). Después de la incubación con los anticuerpos secundarios correspondientes, se procedió al revelado utilizando el kit comercial descrito en el apartado 3.7.1. Los resultados provienen de 6-8 repeticiones de este proceso, y están expresados como la absorbancia relativa obtenida mediante análisis por densitometría. Como control de carga se utilizó β -actina, excepto para los western de p65 en extractos nucleares, donde se empleo Sp1.

3.13. REACTIVOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO

BB1101 (2S-alil-N1-hidroxi-3R-isobutil-N4-(1S-metilcarbamoil-2-feniletil)-succinamida) fue suministrado por British Biotech (Redford et al., 1997; Kupatt et al., 1999), los oligodesoxinucleótidos antisentido o “mismatch” para TNFR1 fueron suministrados por Sigma-Genosys (Reino Unido) y el resto de sustancias químicas se obtuvieron de Sigma (España) o según lo indicado en cada parte del texto. Los resultados se han expresado aplicando la Media \pm Error Estándar (EEM) de cada valor obtenido en los diferentes experimentos realizados. Como análisis estadísticos se han empleado la t de Student o ANOVA seguido del test de Dunnet, excepto para los resultados del test neurológico, en donde los datos se han analizado por el test no paramétrico de Mann-Whitney. El valor $p < 0.05$ se ha considerado estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS

RESULTADOS DEL BLOQUE I

4.1. EFECTO DE UN MODELO *IN VIVO* DE PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CEREBRAL SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO Y LA TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL EN RATA

Como se ha indicado en materiales y métodos, el modelo de preconditionamiento isquémico cerebral empleado en esta tesis doctoral fue descrito inicialmente por Barone una década atrás (Barone et al., 1998) y más tarde utilizado y adaptado en nuestro grupo de trabajo (Cárdenas et al., 2002). La exposición de ratas a PCI produjo una reducción en el volumen de infarto medido 24 horas después de la pMCAO cuando se compara con el volumen de los animales SHAM+pMCAO. Como se observa en la figura 4.1, el volumen de infarto de los animales SHAM+pMCAO fue mayor que el del grupo PCI+pMCAO, produciéndose una reducción del 62% con respecto a SHAM+pMCAO (n=8; *p<0.05; figura 4.1). Por tanto estos resultados indican que el modelo de PCI empleado activa diferentes mecanismos que disminuyen el volumen de infarto y contribuyen, por tanto, al desarrollo de TI.

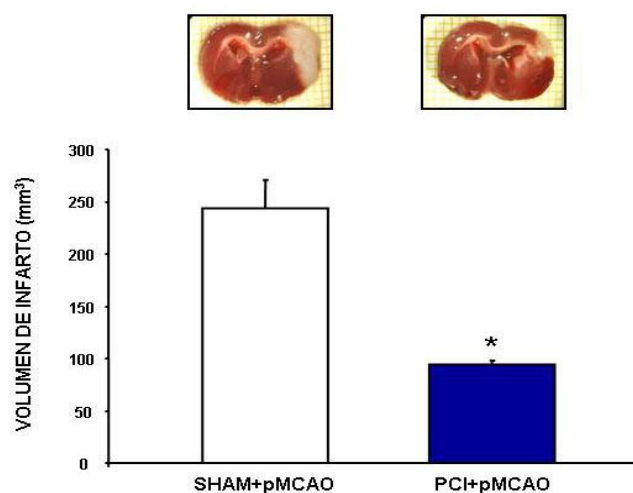


Figura 4.1: Efecto del PCI sobre el volumen de infarto medido 24h después de pMCAO. Los resultados se expresan como la Media \pm E.E.M; n=8; *p<0.05 vs. SHAM+pMCAO.

4.2. EXPRESIÓN Y LOCALIZACIÓN CELULAR DE TACE TRAS EL PCI

La expresión y localización celular de TACE se examinó mediante doble inmunofluorescencia. En los animales SHAM, se observó una débil expresión de esta proteína en células NeuN positivas (neuronas), GFAP positivas (astrocitos) y células lectina positivas (*Lycopersicon esculentum*; microglía; figura 4.2 A, C y E). Por el contrario, el preconditionamiento isquémico produjo un aumento de la inmunorreactividad de TACE en la corteza cerebral, observándose sobre todo en el área que rodea a la zona irrigada por el vaso ocluido, la MCA y 24 horas después del PCI. Aunque este aumento de TACE tras el PCI se detectó también en astrocitos (células GFAP positivas; figura 4.2 D) y microglía (células lectina positivas; figura 4.2 F), la mayor tinción se observó principalmente en neuronas (células NeuN positivas; figura 4.2 B). Además, tras esta isquemia transitoria, algunas células endoteliales pertenecientes a capilares cerebrales, mostraron inmunorreactividad para TACE (células lectina positivas) y también se observó una reacción de la astrogliá alrededor del área ocluida, observando una mayor tinción GFAP en este área.

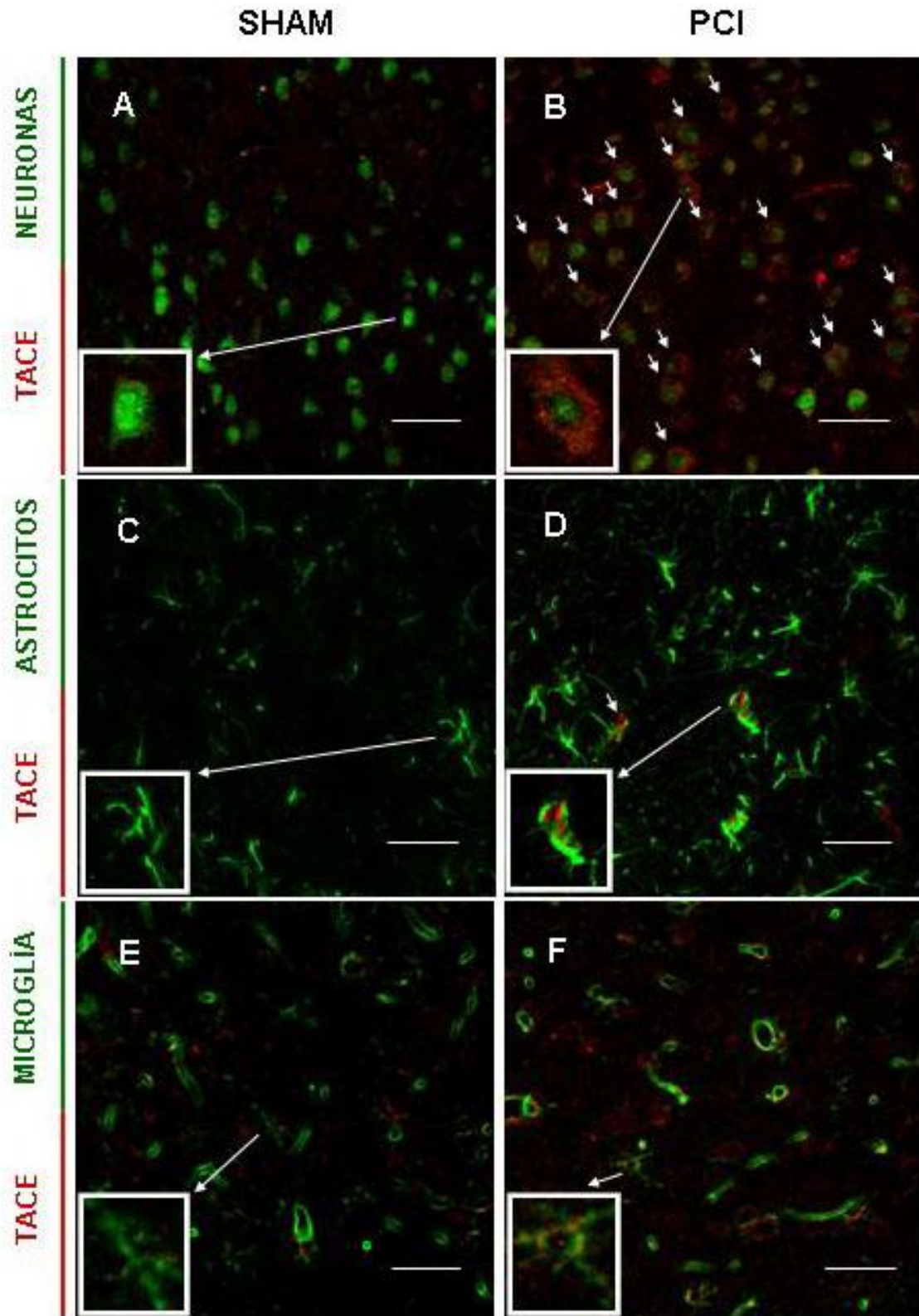


Figura 4.2: Localización celular de TACE. Tinción mediante doble inmunofluorescencia de secciones de cerebros procedentes de animales SHAM (A, C y E) y animales sometidos a PCI (B, D y F). TACE aparece con inmunorreactividad roja, mientras que los marcadores celulares de neuronas (NeuN; A y B), astrocitos (GFAP; C y D) y microglía (Lectina; E y F) aparecen en verde. Las flechas indican células TACE positivas. Escala: 25 μ m.

4.3. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR TIPO I DE TNF- α (TNFR1) TRAS EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Estudios mediante western blot revelaron una banda inmunopositiva para TNFR1 en cerebros del grupo SHAM (Figura 4.3), resultado que no difería de animales no manipulados (datos no mostrados). 24 horas después del preconditionamiento isquémico se observó un aumento en la expresión de TNFR1 respecto al grupo SHAM (Figura 4.3), siendo máximo este aumento a las 48 horas (datos no mostrados). Por el contrario, el tratamiento de animales preconditionados con el inhibidor selectivo de TACE, BB1101, o con un anticuerpo anti-TNF- α , redujo el aumento de TNFR1 que se producía tras el PCI. Por último y como aparece en la figura 4.3, en otro grupo de animales sometidos al PCI y tratados con un oligodeoxinucleótido antisentido para TNFR1 se observó, como era de esperar, una disminución en la expresión de este receptor, fenómeno que no se produjo en el grupo PCI + Mismatch de TNFR1.

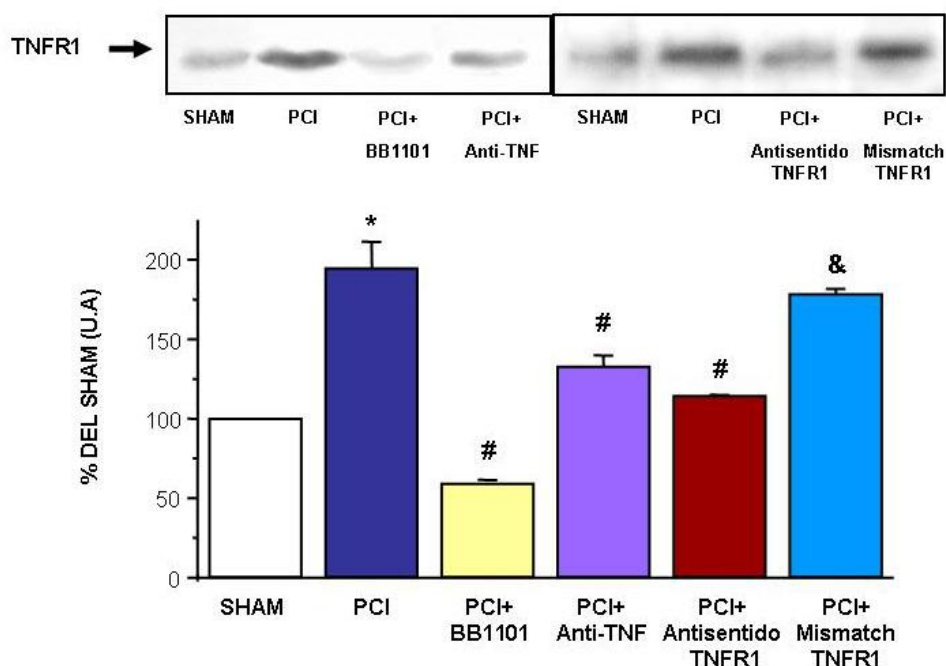


Figura 4.3: Análisis por western blot de TNFR1 en corteza cerebral de animales SHAM, PCI, PCI+BB1101, PCI+Anti-TNF, PCI+Antisentido TNFR1 y PCI+Mismatch TNFR1. El panel inferior corresponde al análisis densitométrico de la banda de TNFR1 normalizada con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la Media \pm E.E.M, $n = 6$; * $p < 0.05$ versus SHAM; # $p < 0.05$ versus PCI y & $p < 0.05$ versus PCI+Antisentido TNFR1.

Mediante western blot se estudió también la expresión del receptor tipo II de TNF- α (TNFR2) en los grupos SHAM y PCI, no observándose ninguna banda inmunopositiva para esta proteína. Debido a esto, todos nuestros estudios se centraron en TNFR1.

4.4. EFECTO DEL PCI SOBRE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE TNFR1

Para determinar el efecto del PCI sobre la localización celular de TNFR1, 24 horas después de dicha maniobra quirúrgica o del procedimiento SHAM, se obtuvieron secciones sobre las que se realizaron técnicas de doble inmunofluorescencia. En las secciones procedentes de animales SHAM no se detectó TNFR1 en ninguno de los tipos celulares estudiados (neuronas, astrocitos y microglía; figura 4.4 A, E y G). El preconditionamiento isquémico produjo un aumento en la inmunorreactividad de TNFR1 únicamente en neuronas (células NeuN positivas; figura 4.4 B), no detectándose dicho receptor ni en astrocitos (figura 4.4 F) ni en microglía (figura 4.4 H). El tratamiento con el inhibidor de la actividad TACE, BB1101 y con el ODN-antisentido de TNFR1 revirtió el aumento de inmunorreactividad de este receptor en neuronas tras el PCI (figura 4.4 C y D respectivamente).

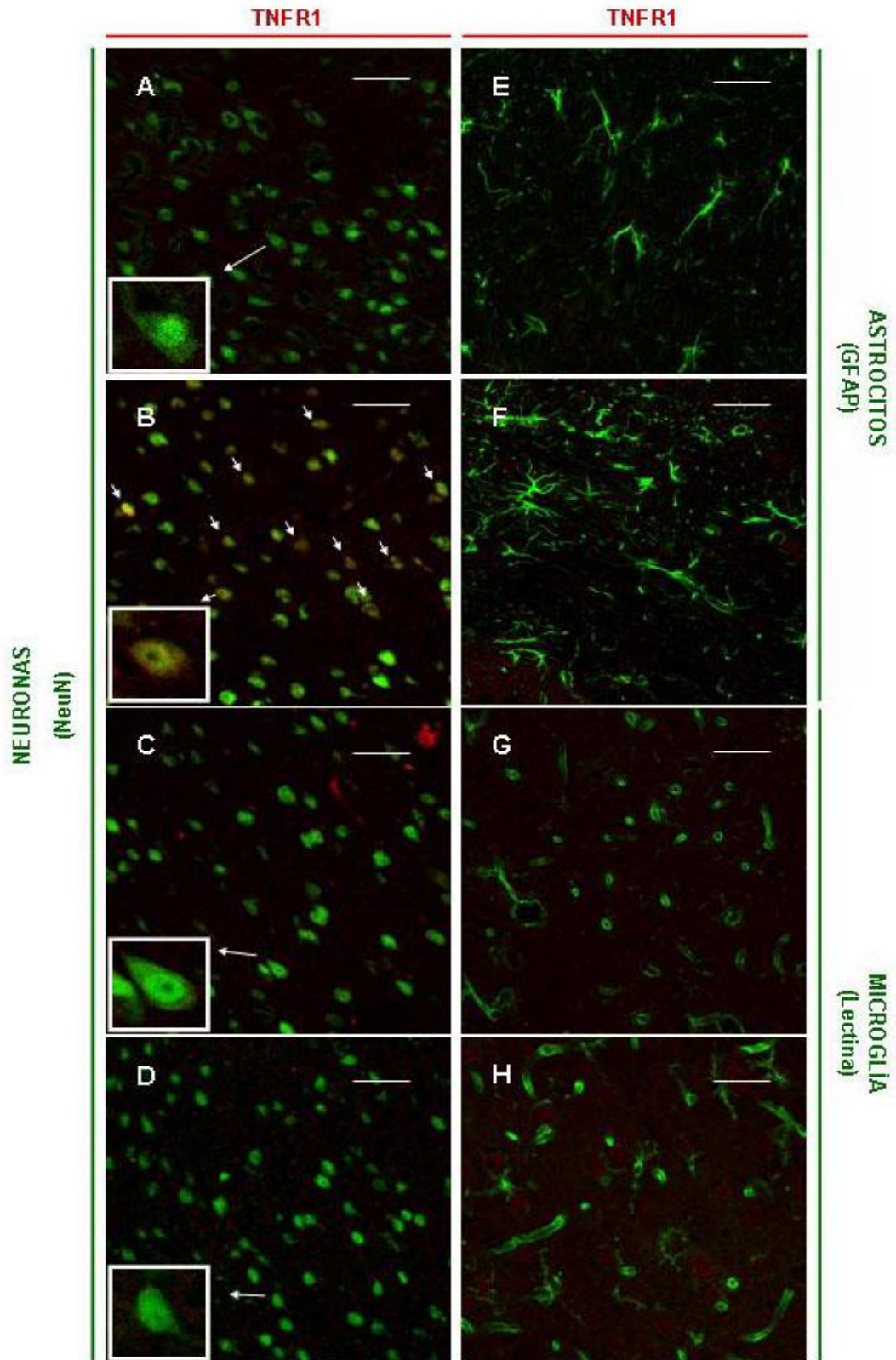


Figura 4.4: Localización celular de TNFR1. Doble inmunofluorescencia de TNFR1 (señal en rojo) y de marcadores celulares (verde): NeuN (neuronas; A-D), GFAP (astrocitos; E, F) y lectina procedente de *L.esculentum* (microglía; G, H) en secciones de cerebros de animales SHAM (A, E y G), sometidos a PCI (B, F y H) y animales sometidos a PCI y tratados con BB1101 (C) o con ODN-antisentido de TNFR1 (D). Las flechas indican células TNFR1 positivas. Escala: 25µm.

4.5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL PCI SOBRE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR κ B (NF- κ B)

Mediante western blot se estudió el efecto del PCI sobre la activación de NF- κ B mediante la detección en el núcleo celular de p65, una de las subunidades de este factor de transcripción. Como se observa en la figura 4.5, el PCI produjo un aumento de la presencia de p65 en el núcleo celular, lo que es sinónimo de un aumento de la traslocación al núcleo y, por tanto, de la activación de NF- κ B 24 y 48 horas después de esta isquemia transitoria en comparación al grupo SHAM (n=6; *p < 0.05). En aquellos animales sometidos al preconditionamiento isquémico y tratados con el inhibidor de la actividad TACE, BB1101, con el inhibidor de TNFR1, ODN- antisentido o con el inhibidor del proteasoma y por tanto de la activación de NF- κ B, lactacistina, la presencia de p65 en el núcleo se vio disminuida, reduciéndose por tanto la activación de este factor de transcripción 24 y 48 horas después de esta isquemia transitoria (PCI, n=6; #p < 0.05). En cambio, el tratamiento con “mismatch”, el oligodeoxinucleótido que se ha empleado como control negativo del antisentido de TNFR1, no redujo la activación de NF- κ B producida por el PCI (n=6; &p < 0.05). Los niveles de p65 detectados mediante western en el núcleo celular en los animales SHAM no diferían de los niveles de esta subunidad encontrados en los animales no manipulados quirúrgicamente (datos no mostrados).

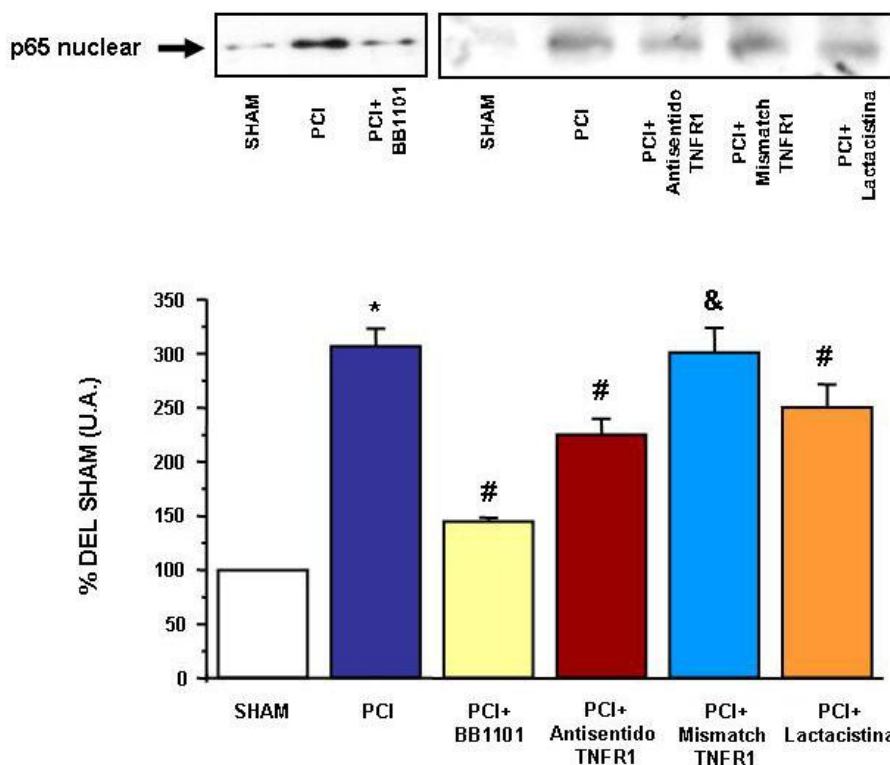


Figura 4.5: Translocación al núcleo de NF- κ B. Estudio por western blot de p65 procedente de extractos nucleares de cerebro de animales SHAM, PCI, PCI+BB1101, PCI+Antisense TNFR1, PCI+BB1101, PCI+Antisense TNFR1, PCI+Mismatch TNFR1 y PCI+Lactacistina. El panel inferior corresponde al análisis densitométrico de la banda de p65 normalizada con la banda de Sp1, como control de carga. Los datos corresponden a la Media \pm E.E.M., n = 6; *p<0.05 versus SHAM; #p<0.05 versus PCI y &p<0.05 versus PCI+Antisense TNFR1.

4.6. EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO Y SOBRE LA TOLERANCIA ISQUÉMICA

Como se indicó en el apartado 4.1, el preconditionamiento isquémico en rata produjo una reducción del 62% en el volumen de infarto con respecto a los animales no preconditionados, 24 horas después de la pMCAO. La administración subcutánea de BB1101 así como la administración intracerebroventricular de un anticuerpo anti-TNF- α disminuyeron significativamente la reducción del volumen de infarto producido por el PCI, estando estos resultados de acuerdo con otros anteriores de nuestro grupo de trabajo (Cárdenas et al., 2002).

La administración intracerebroventricular del oligodeoxinucleótido antisentido de TNFR1 pero no de un ODN-mismatch para el mismo receptor, disminuyó la reducción del volumen de infarto producida por el PCI y medido 24 horas después de la pMCAO (figura 4.6 A). La eficiencia de este ODN-antisentido para inhibir la expresión de TNFR1 se examinó en los experimentos de western blot, en donde se observó que el antisentido inhibía el aumento de expresión de TNFR1 causado por el PCI, cosa que no ocurría con el ODN-mismatch.

Por último y como aparece en la figura 4.6 B, el tratamiento de ratas precondicionadas con lactacistina ocasionó la pérdida de la reducción del volumen de infarto inducida por el PCI. Como se observa también en la figura 4.6 B, lactacistina por si sola redujo el volumen de infarto cuando se comparó con el grupo SHAM+pMCAO ($n=4$; $*p<0.05$ vs. SHAM+pMCAO). En cambio la administración de BB1101 y ODN-antisentido de TNFR1 no afectó al volumen de infarto cuando se compararon estos grupos experimentales con el grupo SHAM+pMCAO (datos no mostrados).

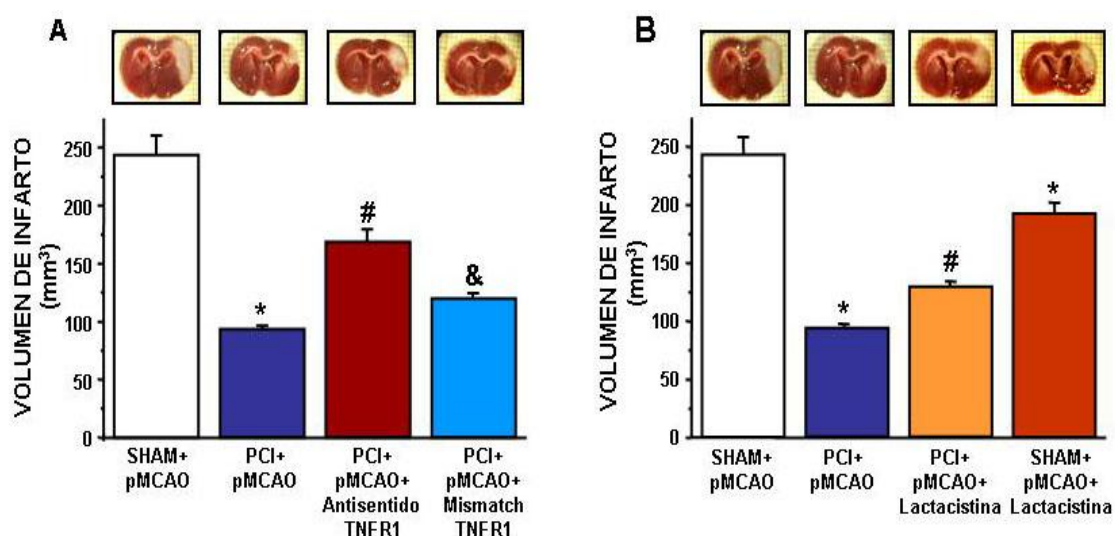


Figura 4.6: Volumen de infarto (mm^3) medido 24 horas después de la pMCAO en animales sometido al PCI (PCI+pMCAO) o al procedimiento sham (SHAM+pMCAO), en animales con PCI y tratados con: antisentido de TNFR1 (PCI+antisentido TNFR1+pMCAO; A), con ODN-mismatch (PCI+mismatch+pMCAO; A), lactacistina (PCI+lactacistina+pMCAO; B) y animales sham tratados con lactacistina y sometidos a pMCAO (SHAM+lactacistina+pMCAO; B). En la figura aparecen fotografías que representan el volumen de infarto en los diferentes grupos experimentales. Los datos están expresados como la Media \pm E.E.M., $n=4-8$; $*p<0.05$ vs. SHAM+pMCAO; $\#p<0.05$ vs. PCI+pMCAO; $\&p<0.05$ vs. PCI+antisentido TNFR1+pMCAO.

4.7. EFECTO DEL PCI Y DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B SOBRE LOS DÉFICITS MOTORES DESPUÉS DE LA pMCAO

Como se ha ido indicando en diferentes apartados, 48 horas después del procedimiento SHAM o del PCI se realizó la oclusión permanente de la MCA. Veinticuatro horas después y previo al sacrificio, los animales se sometieron a un test descrito por Hunter y colaboradores en el año 2000, en el que se valoran diferentes déficits motores. Estos tests revelaron que el PCI producía una mejoría en el computo global de todos los déficits motores evaluados mientras que la inhibición de TACE (con BB1101), la inhibición de TNFR1 (mediante ODN-antisentido) y la de NF- κ B tras el PCI, revertían la mejoría producida por esta isquemia transitoria en los déficits evaluados. En el grupo SHAM+pMCAO+lactacistina, inhibidor de la activación de NF- κ B, se observó también una disminución del valor global de este test respecto del grupo SHAM+pMCAO. Como vemos, los resultados obtenidos en los déficits motores coinciden con los observados en los experimentos de volumen de infarto. Al igual que en el apartado anterior, el número de animales utilizado por grupo ha sido de 4-8 y los valores que aparecen en la tabla siguiente corresponden al número de animales que presenta cada déficit motor por grupo (expresado también en porcentaje) y, como se indicó en materiales y métodos, la puntuación final es el resultado de multiplicar el número de animales que presentan cada déficit motor por los puntos asignados para cada uno y dividido por el total de animales por grupo, siendo el nivel de significación de $p < 0.05$.

PUNTUACIÓN Signos Neurológicos	SHAM+ pMCAO n(%)	PCI+ pMCAO n(%)	PCI+BB+ pMCAO n(%)	PCI+ pMCAO + Antisentido TNFR1 n(%)	SHAM+ pMCAO+ Lactacistina n(%)	PCI+ pMCAO+ Lactacistina n(%)
0	0(0%)	2(25%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
1	1(12.5%)	4(50%)	2(25%)	1(16.6%)	0(0%)	0(0%)
2	1(12.5%)	1(12.5%)	3(37.5%)	4(66.6%)	3(50%)	4(100%)
3	6(75%)	1(12.5%)	3(37.5%)	1(16.6%)	3(50%)	0(0%)
4	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
5	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
TOTAL	2.625	1.125*	2.125#	2#	2.5*	2#

Figura 4.7: Análisis de diferentes déficits motores según el test descrito por Hunter y colaboradores, 2000, en animales sometidos a la pMCAO (SHAM+pMCAO), al PCI+pMCAO y a este mismo protocolo junto con la administración de BB1101, inhibidor de TACE, con ODN-antisentido, inhibidor de TNFR1 y con lactacistina para inhibir NF- κ B. Los datos aparecen como una puntuación total que resulta de multiplicar cada animal por la puntuación de cada déficit y dividido por el total de animales/grupo; n=4-8; *p<0.05 vs. SHAM+pMCAO; #p<0.05 vs. PCI+pMCAO.

4.8. EFECTO DEL PCI SOBRE LA EXPRESIÓN DE EAAC1/EAAT3

Los análisis por western blot revelaron que el transportador de glutamato EAAT3 se expresaba en cerebro de ratas sometidas al procedimiento sham (figura 4.8), resultado que no difería del obtenido en animales no manipulados. En los animales en los que se realizó el PCI, se produjo un aumento en la expresión de EAAT3 24 y 48 horas después de esta isquemia transitoria. Por el contrario, la administración de BB1101 (inhibidor de la actividad TACE) y de un anticuerpo anti-TNF- α redujo el aumento de este transportador tras esta isquemia transitoria (figura 4.8). La administración del antisentido de TNFR1, causó también una disminución de la expresión de EAAT3 tras el PCI (figura 4.8), cosa que no ocurrió con la administración del mismatch (datos no mostrados).

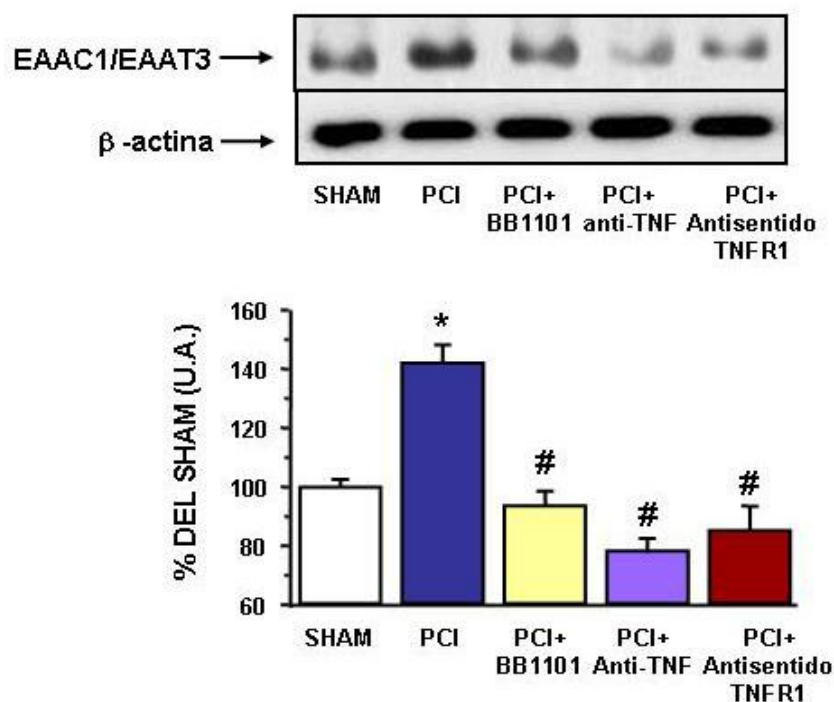


Figura 4.8: Análisis por western blot de EAAT3 en corteza cerebral de ratas SHAM, PCI, PCI+BB1101, PCI+Anti-TNF y PCI+Antisentido TNFR1. El panel inferior corresponde al análisis densitométrico de la banda de EAAT3 normalizada con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la Media \pm E.E.M., $n = 6$; * $p < 0.05$ versus SHAM; # $p < 0.05$ versus PCI.

4.9. EFECTO DEL PCI Y DE LA INHIBICIÓN DE LA VÍA TACE/TNF- α /TNFR1 SOBRE LA LOCALIZACIÓN CELULAR DE EAAC1/EAAT3

La localización celular de EAAT3 se analizó mediante tinción de doble inmunofluorescencia. En las secciones de cerebro procedente de los animales sham se observó inmunorreactividad para EAAT3 en neuronas (células NeuN positivas; figura 4.9A) tanto en el citoplasma como en el núcleo celular.

Al igual que en los experimentos de western blot, el PCI causó un aumento de la inmunorreactividad de EAAT3 en el área cortical que rodea la zona donde se realizó la isquemia transitoria y 24 horas después de la misma. Este aumento se observó en células NeuN positivas (neuronas, fig. 4.9B) y sobre todo en la membrana celular celular.

Los tratamientos con BB1101, con anti-TNF- α y con ODN-antisentido para TNFR1 (figura 4.9 C, D y E respectivamente), produjeron una reducción en la inmunorreactividad de EAAT3. Después de cada uno de los tratamientos se observó una disminución en el número de células EAAT3/NeuN positivas en comparación con el grupo de animales sometidos únicamente al PCI. En estos grupos tratados, la localización de EAAT3 se mantuvo en la corteza cerebral, tanto en el citoplasma como en la superficie celular, aunque con menor intensidad.

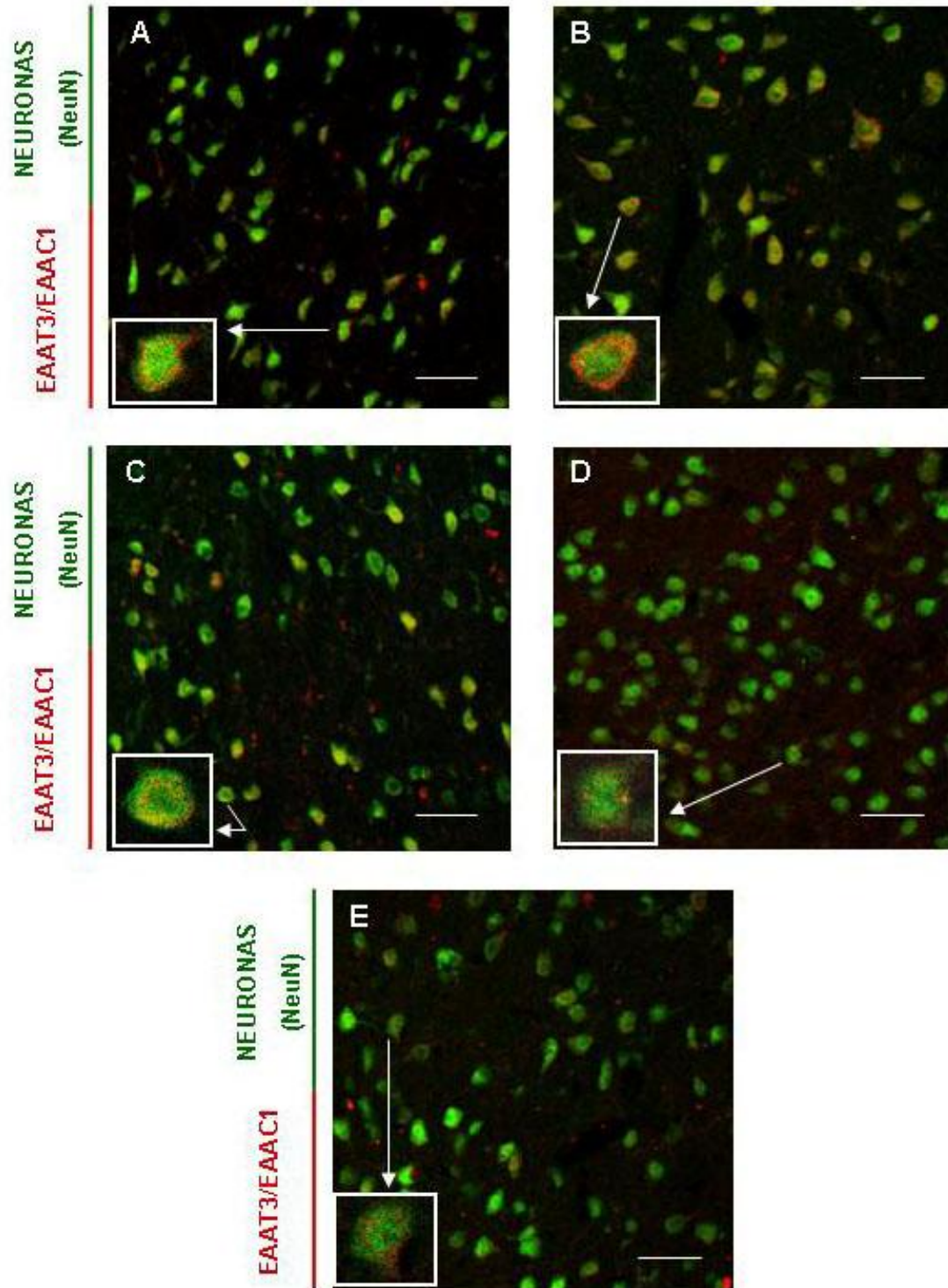


Figura 4.9: Localización celular de EAAT3. Doble inmunofluorescencia para EAAT3 que aparece en rojo, mientras que el marcador celular de neuronas, NeuN, aparece en verde (A-E). Cada imagen corresponde a secciones de cerebros de animales (rata) SHAM (A), sometidos al PCI (PCI, B), PCI+BB1101 (C), PCI+anti-TNF (D) y PCI+antisense TNFR1 (E). Las flechas indican células EAAT3 positivas. Escala: 25 μ m.

4.10. EXPRESIÓN DE EAAT3 TRAS EL PCI Y LA INHIBICIÓN DE NF-

κ B

A partir de los extractos citoplasmáticos y mediante western blot se ha estudiado la expresión de EAAT3 en esta parte de la célula y en animales sham, preconditionados y tratados con el inhibidor de la activación de NF- κ B, lactacistina. Así podemos ver en la figura 4.10 que, al igual que lo ocurrido en extractos de corteza cerebral completa, el PCI produjo un aumento en la expresión de EAAT3 respecto al grupo sham, cuando se estudió dicho transportador 24 horas después de esta isquemia transitoria. Estos resultados coinciden con los observados en los análisis de doble inmunofluorescencia, en donde veíamos un aumento de EAAT3 tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática respecto del grupo sham. Por el contrario, el tratamiento de animales preconditionados con lactacistina, produjo una disminución de la expresión de EAAT3 respecto del grupo PCI, reduciéndose estos niveles casi al del grupo sham (figura 4.10). En la siguiente figura se observa una imagen representativa de los western blot realizados para EAAT3 en citoplasma y el gráfico inferior corresponde a la densitometría de los mismos normalizada por la banda de β -actina, como control de carga. Los datos se expresan como porcentaje respecto del sham y en unidades arbitrarias y aparecen como la Media \pm E.E.M.

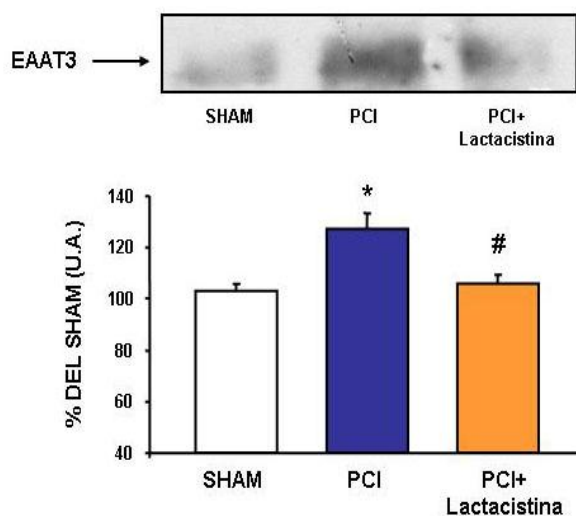


Figura 4.10: Análisis por western blot de la expresión en citoplasma de EAAT3 procedente de animales SHAM, PCI y PCI+lactacistina. El panel inferior corresponde al análisis densitométrico de la banda de EAAT3 normalizada con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la Media \pm E.E.M, n = 6; *p<0.05 versus SHAM; #p<0.05 versus PCI.

4.11. EFECTO DEL PCI SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLAST/EAAT1

Como sabemos, GLAST/EAAT1 es uno de los transportadores de glutamato expresados en cerebro y localizado principalmente en la glía. La expresión de este transportador se ha analizado mediante western blot en extractos procedentes de corteza cerebral de rata en los diferentes grupos experimentales. Así, hemos observado una banda correspondiente a EAAT1 en corteza de cerebro procedente de animales sham, resultado que no fue diferente del obtenido en animales control (sin manipulación; datos no mostrados). Al contrario de lo ocurrido para el EAAT3, ni el PCI ni los tratamientos con BB1101, anti-TNF- α y ODN-antisentido de TNFR1 modificaron la expresión de este transportador cuando se estudió 24 y 48 horas después de estos protocolos experimentales. En la siguiente figura se observa una imagen representativa de los western blots realizados para EAAT1 y el gráfico inferior corresponde a la densitometría de los mismos normalizada por la banda de β -actina, como control de carga. Los datos se expresan como porcentaje respecto del sham y en unidades arbitrarias y aparecen como la media \pm error estándar.

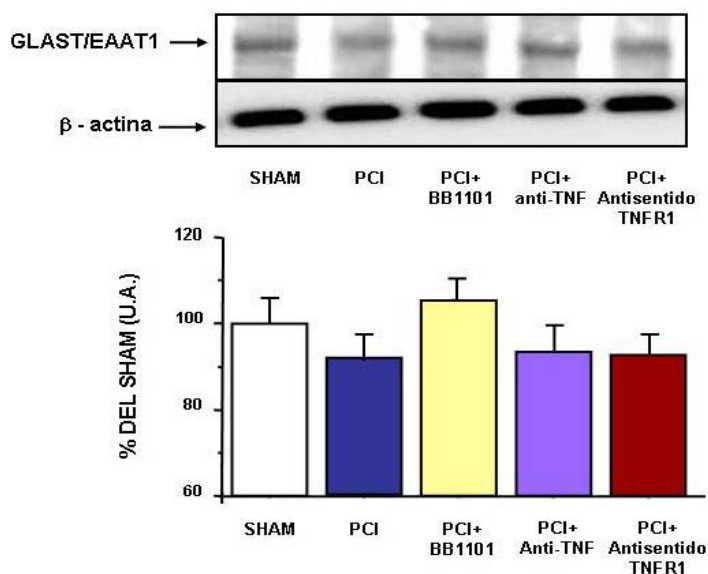


Figura 4.11: Análisis por western blot de GLAST/EAAT1 en cerebro procedente de animales SHAM, animales con PCI y PCI+BB1101, PCI+anti-TNF y PCI+antisentido TNFR1. La imagen superior corresponde a un western blot para esta proteína, y el gráfico inferior muestra la densitometría de las bandas para EAAT2 normalizadas por la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la Media \pm E.E.M., n=6.

4.12. EFECTO DEL PCI SOBRE LA EXPRESIÓN DE GLT1/EAAT2

El estudio de GLT1/EAAT2, uno de los transportadores gliales de glutamato, se ha analizado en esta tesis doctoral, mediante técnicas de western blot en extractos procedentes de corteza cerebral de animales pertenecientes a los diferentes grupos experimentales explicados en materiales y métodos. De esta forma se ha observado una banda perteneciente a EAAT2 en corteza cerebral de animales sham, resultado que no difería del obtenido en animales sin manipulación. Por otro lado, y al contrario que los resultados obtenidos para EAAT1 24 y 48 horas después del PCI, se observó un aumento en la expresión de EAAT2 respecto del grupo SHAM (figura 4.12). El análisis de animales sometidos al PCI y tratados con BB1101 (inhibidor de TACE), con anti-TNF- α y con ODN-antisentido de TNFR1, reveló que la expresión de EAAT2 no difería de la obtenida después del PCI sin tratamiento.

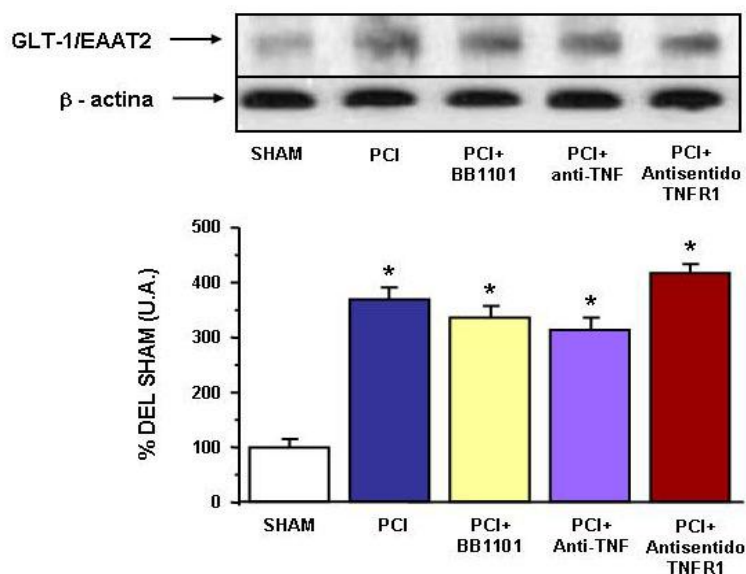


Figura 4.12: Análisis por western blot de GLT1/EAAT2 en cerebro procedente de animales SHAM, animales con PCI y PCI+BB1101, PCI+anti-TNF y PCI+antisentido TNFR1. La imagen superior corresponde a un western blot para esta proteína, y el gráfico inferior muestra la densitometría de las bandas para EAAT2 normalizadas por la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la Media \pm E.E.M., n=6; *p<0.05 versus SHAM.

RESULTADOS DEL BLOQUE II

4.13. EFECTO DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO CEREBRAL SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO Y LA TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL EN UN MODELO *IN VIVO* EN RATÓN

El modelo de PCI empleado en ratón es un modelo de isquemia subletal global y transitoria descrito por Wu y colaboradores en 2001. Como se indicó en materiales y métodos, se ensayaron tres tiempos de PCI: 4min, 6 y 8min. Tras los 4min de isquemia, tanto la protección (reducción del volumen de infarto) como la mortalidad observadas fueron nulas. El tiempo de 8min de isquemia se descartó debido a que la protección no era mayor que para el grupo de 6 minutos, y la mortalidad de los animales se situó alrededor del 60%. Por último el tiempo de PCI seleccionado fue el de 6min por la protección que confería y por la baja mortalidad (20%). Cuarenta y ocho horas después de la isquemia subletal se realizó la oclusión permanente de la MCA (pMCAO), midiéndose el volumen de infarto 24 horas después de esta oclusión. Como se observa en el gráfico, el PCI produjo una reducción en el volumen de infarto del 60,8% en comparación con el grupo SHAM+pMCAO en los ratones empleados como control, C57BL/ScSn.

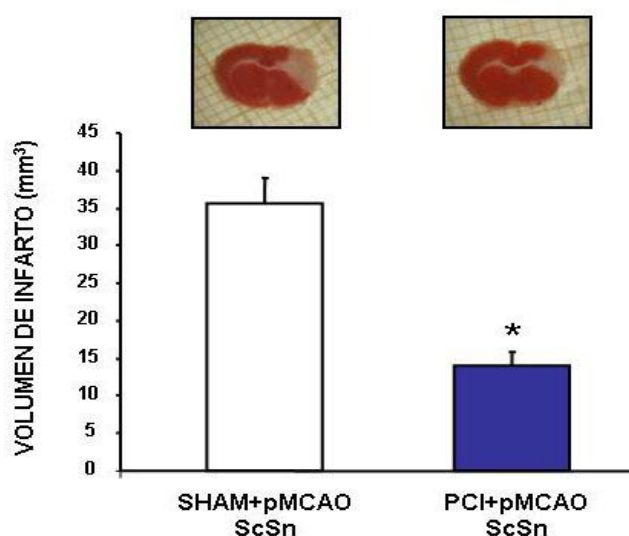


Figura 4.13: Efecto del PCI sobre el volumen de infarto medido 24h después de pMCAO en ratones C57BL/10ScSn. Los resultados se expresan como la Media \pm E.E.M; n=8; *p<0.05 vs. SHAM+pMCAO.

4.14. PAPEL DE TLR4 SOBRE EL VOLUMEN DE INFARTO Y LA TOLERANCIA ISQUÉMICA CEREBRAL

Animales C57BL/10ScSn (ScSn), que expresan TLR4 y, animales C57BL/10ScNJ (ScNJ), que poseen una delección en el gen de este receptor, se sometieron al PCI y a una posterior oclusión permanente de la MCA. Así se observó que los ratones ScSn (animales con TLR4) sometidos a PCI, previo a la pMCAO, presentaban menor volumen de infarto, en comparación su grupo SHAM+pMCAO siendo esta reducción del 60,8%. En los ratones ScNJ, TLR4 deficientes, el PCI causó una menor reducción del volumen de infarto en comparación con su grupo SHAM+pMCAO, siendo esta disminución únicamente del 18%. También pudimos comprobar las mismas diferencias que las obtenidas en resultados previos de nuestro grupo (Caso et al., 2007), con respecto a los grupos SHAM+pMCAO ScSn y ScNJ. Así pudimos observar que los ratones TLR4 deficientes presentaban menor volumen de infarto en comparación a sus controles (animales que expresan este receptor), siendo esta diferencia del 20,7% (figura 4.14).

Por tanto y como se observa en la figura 4.14, los ratones con TLR4 (ScSn) tras el PCI presentan una mayor reducción del volumen de infarto en comparación con los animales que carecen de este receptor.

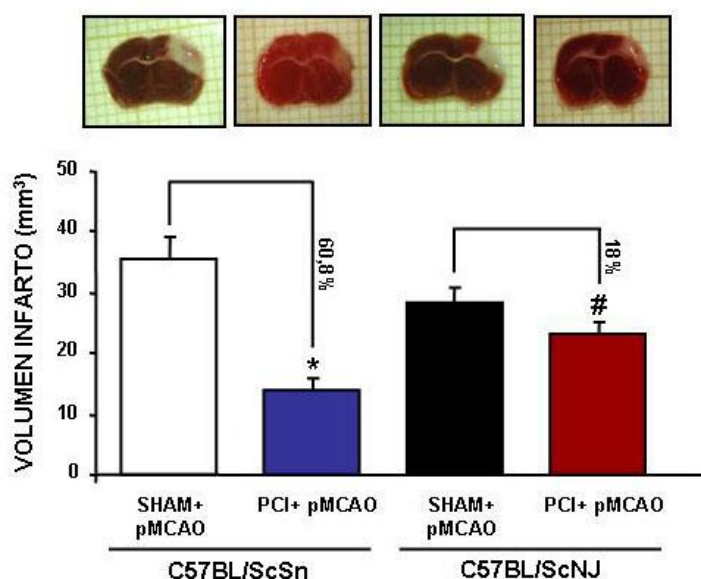


Figura 4.14: Efecto de TLR4 sobre el volumen de infarto 24h después de PCI+pMCAO en ratones C57BL/ScNJ (TLR4 deficientes) respecto a sus controles C57BL/ScSn. Los resultados se expresan como la Media \pm E.E.M y en mm³; n=8; *p<0.05 vs. SHAM+pMCAO ScSn; #p<0.05 vs. SHAM+pMCAO ScNJ.

4.15. EFECTO DE TLR4 SOBRE LOS DÉFICITS MOTORES DESPUÉS DEL PCI

Como se indicó en materiales y métodos, 24 horas después de la pMCAO y previo al sacrificio de los animales se les sometió a un test descrito por Hunter y colaboradores en el año 2000, en el que se valoran diferentes déficits motores. Los resultados obtenidos tras la medición de estos tests revelaron que el PCI producía una mejoría en el cómputo global de los déficits motores evaluados tanto en animales TLR4 deficientes (ScNJ) como en sus controles (ScSn) respecto a sus grupos de animales sometidos únicamente a pMCAO. Esta mejoría fue mucho mayor en los animales que expresan de forma normal TLR4 (PCI+pMCAO ScSn) que en los animales que carecen de este receptor (PCI+pMCAO ScNJ). También se observa que la diferencia en los resultados de los test entre los grupos SHAM+pMCAO ScSn y ScNJ coincide con los obtenidos en el apartado anterior para el volumen de infarto, observándose también una mejoría estadísticamente significativa en los animales pMCAO sin TLR4 (pMCAO ScNJ) respecto de sus controles. De nuevo se puede afirmar que estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente por Caso y colaboradores en 2007. Los valores que aparecen en la tabla siguiente corresponden al número de animales que presenta cada déficit motor por grupo (expresado también en porcentaje). La puntuación final se obtuvo como se indica en el apartado 3.5.2 de materiales y métodos.

PUNTUACIÓN Signos Neurológicos	SHAM+pMCAO C57BL/ScSn (n=8)	PCI+pMCAO C57BL/ScSn (n=8)	SHAM+pMCAO C57BL/ScNJ (n=8)	PCI+pMCAO C57BL/ScNJ (n=8)
Sin déficits (0)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Flexión miembro contralateral (1)	2 (25%)	8 (100%)	4 (50%)	7 (87,5%)
Movimiento circular contralateral (2)	4 (50%)	0 (0%)	4 (50%)	1 (12,5%)
Giro contralateral espontáneo (3)	2 (25%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Coma (4)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
TOTAL	2	1*	1,5	1,125#

Figura 4.15: Análisis de diferentes déficits motores según el test descrito por Hunter y colaboradores (2000), en animales C57BL/ScNJ, TLR4 deficientes y en animales C57BL/ScSn, con TLR4 sometidos a la pMCAO (SHAM+pMCAO) o al PCI+pMCAO. Los datos aparecen como una puntuación total que resulta de multiplicar cada animal por la puntuación de cada déficit y dividido por el total de animales/grupo; n=8; *p<0.05 vs. SHAM+pMCAO ScSn; #p<0.05 vs. SHAM+pMCAO ScNJ.

4.16. EFECTO DE TLR4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE iNOS TRAS EL PCI

El análisis de la expresión de iNOS realizado mediante western blot reveló una banda inmunopositiva para esta proteína en corteza cerebral de animales del grupo SHAM, tanto en los ratones ScSn como en los ScNJ, resultado que no difería entre ambos grupos sham. Tampoco se observó diferencia entre la banda obtenida en estos grupos sham y la obtenida en animales no manipulados (datos no mostrados). El PCI produjo un aumento en la expresión de iNOS en ambas estirpes de ratón respecto a sus respectivos grupos SHAM, estudiado 24 horas después de esta isquemia transitoria. En cambio, el aumento producido en los ratones que tenían TLR4 (ScSn) fue mucho mayor que para los animales deficientes para este receptor. Los datos se expresan como porcentaje respecto del sham y en unidades arbitrarias.

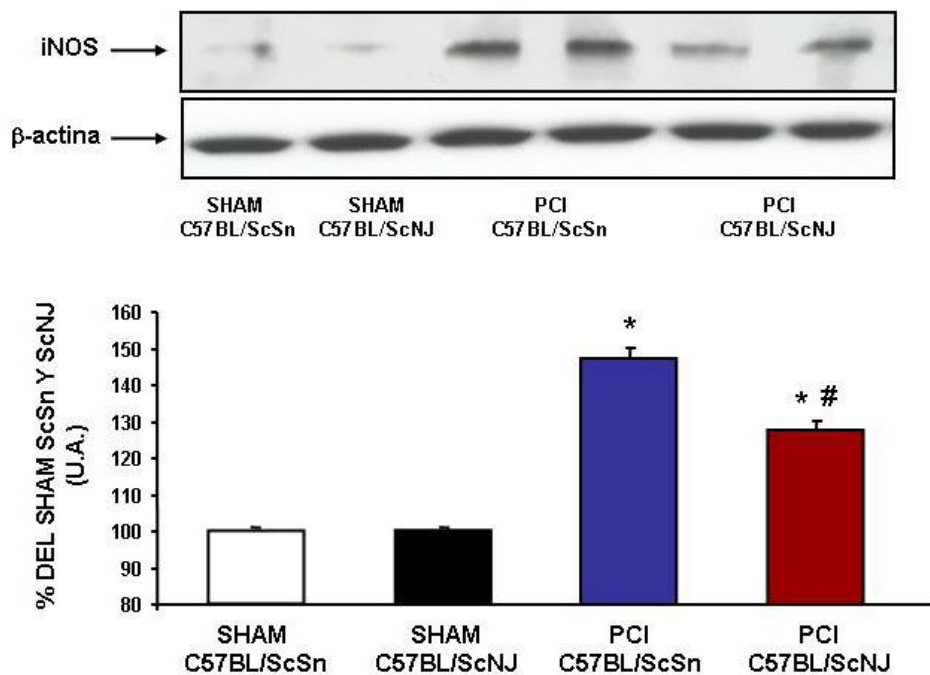


Figura 4.16: Análisis por western blot de iNOS en corteza cerebral de animales SHAM y sometidos al PCI que expresan TLR4 (SHAM y PCI ScSn) y de animales deficientes de este receptor (SHAM y PCI ScNJ). El panel inferior corresponde al análisis densitométrico de la banda de iNOS normalizada con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m., $n = 6$; * $p < 0.05$ versus SHAM ScSn y SHAM ScNJ; # $p < 0.05$ versus PCI ScSn.

4.17. PAPEL DE TLR4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE COX-2 DESPUÉS DEL PCI

El efecto de la activación de TLR4 sobre la expresión de COX-2 se estudió utilizando la técnica de western blot. En primer lugar tenemos que indicar que se observó una banda positiva para esta proteína en cortezas cerebrales procedentes de animales SHAM tanto ScNJ (TLR4 deficientes) como en sus controles, ScSn, que sí expresan este receptor. Al igual que en los resultados anteriores, se observó que la expresión de COX-2 no difería entre los grupos sham y la expresión observada en animales no manipulados. Veinticuatro horas después del PCI se produjo, tanto en animales ScSn (con TLR4), como en los animales deficientes de este receptor (ScNJ), un aumento en la expresión de COX-2, siendo este aumento superior en los animales que expresaban TLR4. Por tanto y según se observa en la figura 4.17, el PCI produjo un aumento en la expresión de COX-2 mucho mayor en los animales que expresan TLR4 respecto de su grupo sham y respecto de los animales preconditionados y TLR4 deficientes. Los datos se aparecen como porcentaje respecto del sham y en unidades arbitrarias.

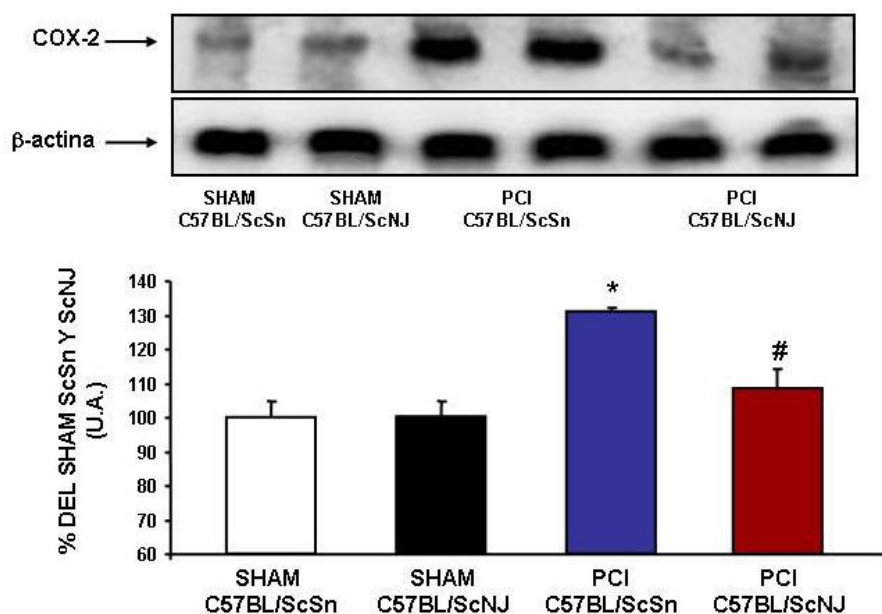


Figura 4.17: Análisis por western blot de COX-2 en corteza cerebral de animales SHAM y sometidos al PCI que expresan TLR4 (SHAM y PCI ScSn) y de animales deficientes para este receptor (SHAM y PCI ScNJ). El panel inferior corresponde al análisis densitométrico de la banda de COX-2 normalizada con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m., $n = 6$; * $p < 0.05$ versus SHAM ScSn y SHAM ScNJ; # $p < 0.05$ versus PCI ScSn.

4.18. EFECTO DE LA ACTIVACIÓN DE TLR4 SOBRE LA EXPRESIÓN DE MMP9 TRAS EL PCI

Al igual que en los estudios de iNOS y COX-2, la expresión de MMP9 se analizó por western blot, estudiándose también el efecto de TLR4 después del PCI sobre la expresión de esta proteína. Como se observa en la figura, se obtuvieron dos bandas para MMP9, una correspondiente a la pro-forma y la otra a la forma madura de MMP9, en animales sham de ambas estirpes de ratón (con y sin TLR4). Por el contrario, el PCI produjo un aumento en la expresión de la pro-MMP9 en ambos tipos de ratón y no varió la expresión de la forma madura. El aumento de la proforma de esta proteína fue significativamente mayor en animales precondicionados con TLR4 (PCI ScSn) respecto del grupo de ratones precondicionados y deficientes para este receptor. Al igual que iNOS y COX-2, estos estudios se realizaron 24 horas después del procedimiento sham o del PCI.

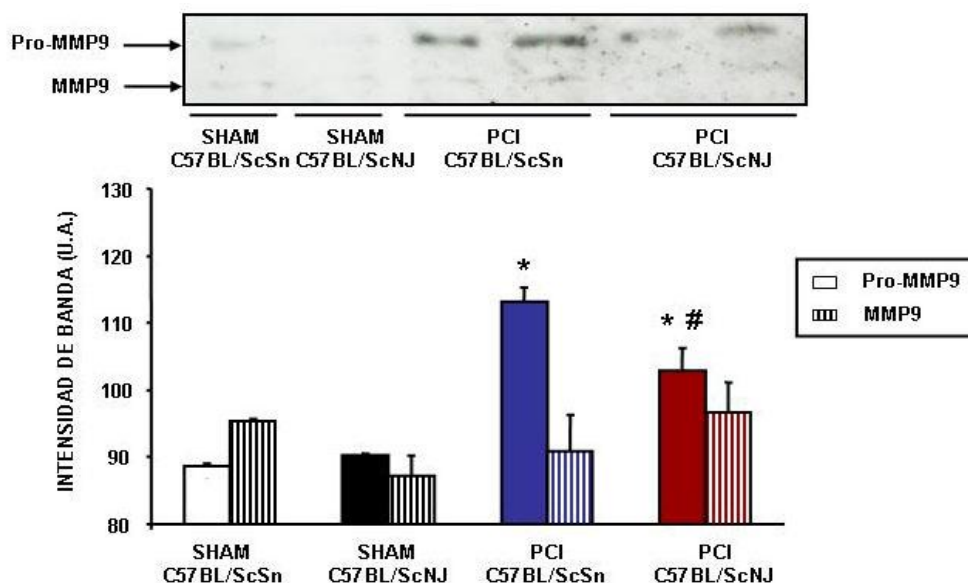


Figura 4.18: Análisis por western blot de MMP9 en corteza cerebral de animales SHAM y sometidos al PCI que expresan TLR4 (SHAM y PCI ScSn) y de animales deficientes para este receptor (SHAM y PCI ScNJ). Para esta proteína aparecen dos bandas, una correspondiente a la pro-forma y la otra a la forma madura de MMP9. El panel inferior corresponde al análisis densitométrico ambas bandas normalizadas con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m., $n = 6$; * $p < 0.05$ versus SHAM ScSn y SHAM ScNJ; # $p < 0.05$ versus PCI ScSn.

4.18. PAPEL DE TLR4 SOBRE LA ACTIVACIÓN DE NF- κ B 18h DESPUÉS DEL PCI

Dieciocho horas después del PCI o del procedimiento sham, se obtuvieron extractos nucleares y citosólicos en los que mediante western blot, se analizó la activación de NF- κ B, mediante la presencia en núcleo de uno de sus monómeros, p65, o la desaparición de I κ B α del citoplasma celular. Este factor de transcripción, en condiciones normales, se encuentra en el citoplasma secuestrado por el complejo inhibidor I κ B. Cuando se reciben las señales oportunas, este complejo inhibidor es degradado por el proteasoma, liberando de esta manera a NF- κ B que puede ir al núcleo para ejercer su función como factor de transcripción.

En estos análisis se observaron bandas inmunopositivas tanto para p65 como para I κ B α en extractos nucleares y citosólicos, respectivamente, de animales Sham ScSn (con TLR4) como en animales Sham ScNJ, deficientes para este receptor. La expresión de estas proteínas entre ambas estirpes de ratón no difería entre animales sham y animales no manipulados quirúrgicamente (control). En los animales que expresan TLR4 se observó que el PCI produjo: 1) por un lado, un aumento en los niveles de p65 en núcleo respecto del grupo Sham, siendo este aumento mayor en los animales precondicionados que expresan TLR4 con normalidad que para los animales precondicionados y deficientes para este receptor (ScNJ); y 2) se observó una disminución en la expresión de I κ B α en estos animales ScSn respecto del grupo sham y del grupo ScNJ.

Por tanto los resultados indican que 18 horas después del PCI, en los animales que expresan TLR4 se produjo un mayor aumento en la activación de NF- κ B, analizado por la presencia de p65 en núcleo o la desaparición de I κ B α del citoplasma, respecto de los animales deficientes para este receptor. Los datos se expresan como porcentaje respecto del sham y en unidades arbitrarias.

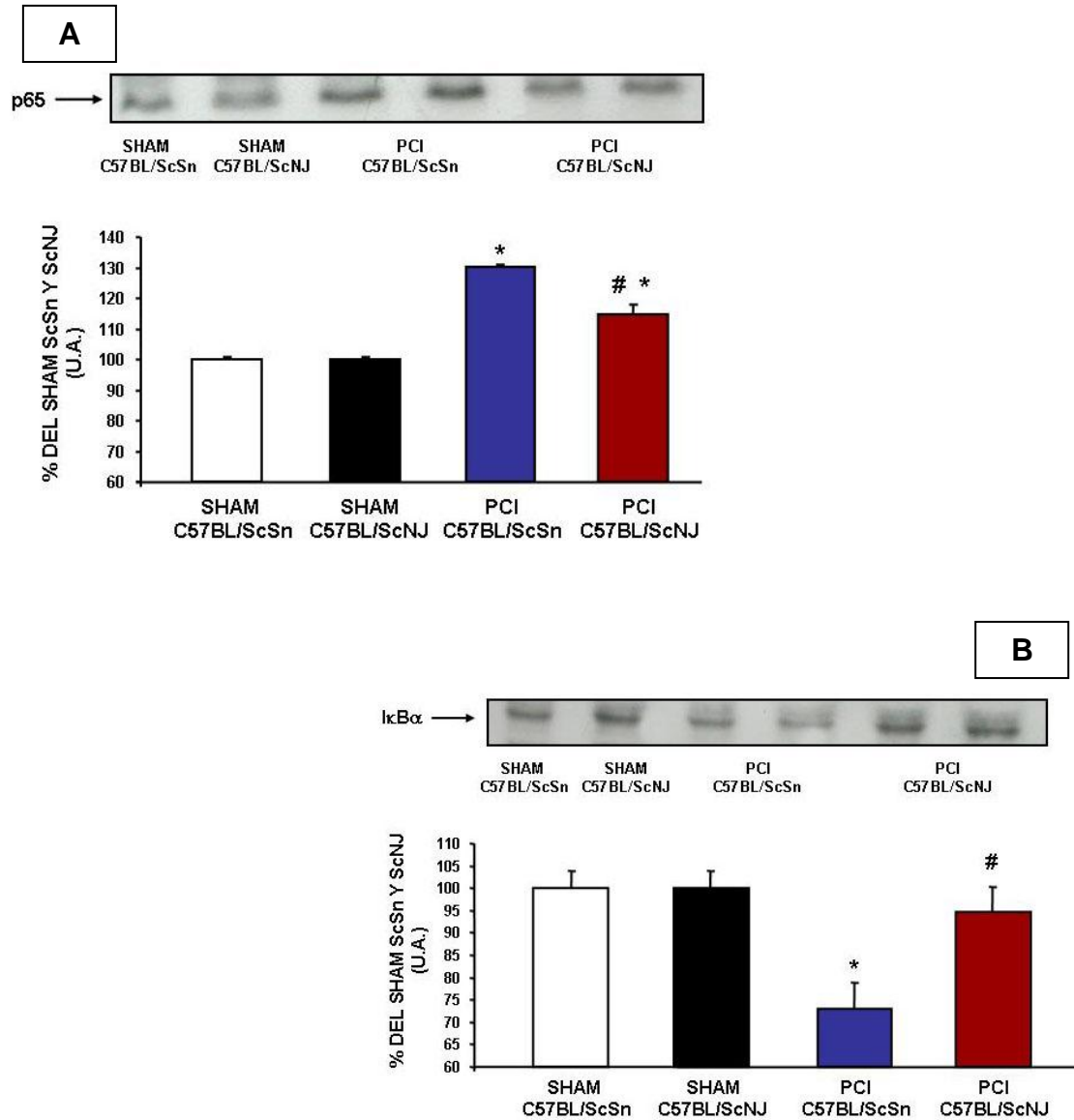


Figura 4.19: Análisis por western blot de la activación de NF- κ B mediante la presencia de p65 en extractos nucleares (A) y la desaparición de I κ B α en extractos citosólicos (B) procedentes de corteza cerebral 18h después del procedimiento SHAM y del PCI en animales que expresan TLR4 (SHAM y PCI ScSn) y de animales deficientes para este receptor (SHAM y PCI ScNJ). Los paneles inferiores tanto en A como en B, corresponden al análisis densitométrico de las bandas de p65 normalizada con la banda de Sp1 (A) y de I κ B α (B) normalizada con la banda de β -actina, como control de carga. Los datos corresponden a la media \pm e.e.m., $n = 6$; * $p < 0.05$ versus SHAM ScSn y SHAM ScNJ; # $p < 0.05$ versus PCI ScSn.

5. DISCUSIÓN

- **BLOQUE I: La vía TACE/TNF- α y los mecanismos de recaptación de glutamato están implicados y relacionados en los fenómenos de PCI a través de mecanismos comunes como la activación de NF- κ B.**

Los fenómenos de preconditionamiento y tolerancia se conocen desde muy antiguo, y han recibido a lo largo de la historia diferentes denominaciones. En la bibliografía existen evidencias de estos fenómenos en casi todos los órganos, incluido el cerebro. Además, estos fenómenos, se han observado incluso en el hombre, demostrándose que pacientes que habían sufrido un accidente isquémico transitorio y, cercano en el tiempo, un ictus isquémico más grave presentaban un menor daño cerebral y una mejor recuperación, que aquellos en los que este período corto de isquemia no se había producido (Moncayo et al., 2000; Weih et al., 1999). Aun así, los mecanismos que intervienen en el desarrollo de tolerancia ante una isquemia cerebral no se conocen a la perfección. Por este motivo hemos intentado estudiar algunas de las vías implicadas en la TI empleando dos modelos experimentales de PCI, uno realizado en rata y otro en ratón.

I.a) Efecto neuroprotector del PCI

Uno de los modelos experimentales que se ha empleado en esta tesis doctoral para estudiar el desarrollo de TI en rata, fue descrito por Barone en 1998 (Barone et al., 1998) y más tarde adaptado por nuestro grupo de trabajo (Cardenas et al., 2002). Así, por los resultados obtenidos, podemos ver que el PCI produce una reducción del volumen de infarto del 62% y una mejoría de los déficits motores analizados respecto del grupo de animales sometidos a isquemia permanente y sin PCI previo. Por tanto podemos afirmar que estos resultados están en concordancia con resultados previos de nuestro laboratorio y que nuestro modelo de PCI en rata activa diferentes mecanismos neuroprotectores que conducen al desarrollo de TI, medida por la reducción del volumen de infarto y la mejoría en los déficits motores.

I.b) Mecanismos implicados en el desarrollo de TI

En cuanto a los mecanismos responsables del desarrollo de TI, existen muchas evidencias experimentales que han implicado diferentes vías, pero sigue siendo un fenómeno poco conocido. Por estos trabajos se sabe que la TI se produce en dos fases: 1) la tolerancia temprana, que se establece en minutos y se caracteriza por cambios metabólicos, activación de proteínas, etc., es independiente de la síntesis de nuevas proteínas y confiere protección para unas horas; 2) tolerancia tardía, que requiere para su desarrollo desde horas hasta días y los mecanismos que la producen son, por ejemplo, la supresión de genes, expresión y síntesis de nuevas proteínas, siendo la protección que confiere más duradera.

Ya dentro de los mecanismos que han demostrado un papel importante en la tolerancia, podemos destacar dos tipos: mecanismos de defensa celular y la respuesta celular al estrés. Dentro del primer grupo, se sabe que la producción de citoquinas pro-inflamatorias interviene en el desarrollo de TI, siendo una de ellas TNF- α . Una de las evidencias experimentales que existían referente a este tema era que la administración de TNF- α protegía al cerebro frente al daño inducido por la oclusión de la arteria cerebral media ((Nawashiro et al., 1997)). Esta citoquina es una proteína que se encuentra, en un principio, unida a la membrana y es procesada en su forma soluble por la enzima convertidora de TNF- α , también conocida como TACE/ADAM17 (Black et al., 1997; Moss et al., 1997). Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado por vez primera la presencia de TACE en cerebro y su implicación, tanto *in vitro* como *in vivo*, en la neuroprotección causada por TNF- α tras el PCI (Hurtado et al., 2001; Hurtado et al., 2002; Cárdenas et al., 2002; Romera et al., 2004).

Por otro lado, los transportadores de glutamato son los encargados de recaptar el glutamato del espacio sináptico al interior de la célula, para así poner fin a la excitación glutamatérgica y evitar el daño excitotóxico (Danbolt, 2001). Esta función los hace unas buenas dianas para el estudio de su papel neuroprotector tras el PCI *in vivo*, siendo este el motivo por el que se han analizado en esta tesis doctoral.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se ha analizado el efecto de TACE/TNF- α después del PCI *in vivo* sobre la expresión de los receptores de

TNF y la activación de NF- κ B, así como la influencia de esta vía sobre la expresión de los EAATs y su papel en la adquisición de tolerancia isquémica cerebral.

I.c) Implicación de TACE en la TI

En primer lugar, por nuestros resultados se confirma la presencia de TACE en cerebro, aunque a niveles bajos como lo demuestra la baja inmunorreactividad para esta proteína en neuronas, astrocitos y microglía en situación control. Sin embargo, el PCI produce un aumento en la expresión de TACE en todos los tipos celulares estudiados, siendo este aumento más pronunciado en neuronas. En este sentido, existen trabajos en donde también se confirma la expresión de TACE en neuronas y en tejido cerebral completo (Skovronsky et al., 2001; Goddard et al., 2001). Por tanto, el aumento de expresión de TACE observado mediante doble inmunofluorescencia tras el PCI, unido a resultados anteriores que mostraban el aumento de esta proteína mediante western blot, demuestran la presencia de TACE en cerebro, el aumento de su expresión en astrogliá, microglía y sobre todo en neuronas después del PCI. Por último la disminución de la TI tras su inhibición con BB1101 (Cárdenas et al., 2002), apoya fuertemente su participación en el desarrollo de TI.

I.d) Implicación de TNF- α y de sus receptores en la TI

Como se ha indicado en la introducción, TNF- α es una citoquina que se expresa y libera tras la isquemia (Liu et al., 1994) y contribuye en el daño que se produce en esta patología (para revisión ver Shohami et al., 1999). Por otro lado se ha demostrado que, tras el preconditionamiento, se produce un aumento en el ARNm de TNF- α (Wang et al., 2000), y que esta citoquina juega un papel protector en esta situación (Liu et al., 2000; Ginis et al., 2002); de hecho, TNF- α es el principal inductor de la tolerancia isquémica tras el PI con LPS (Rosenzweig et al., 2007). En este sentido, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la inhibición de esta citoquina tras el PCI revierte la reducción del volumen de infarto inducido por esta isquemia transitoria, lo que indica el papel importante de TNF- α en la TI (Cárdenas et al., 2002).

En cuanto a los receptores de TNF- α , nuestro trabajo aporta la primera observación de un aumento en la expresión de TNFR1 después del PCI. En los análisis por western blot realizados para este receptor se demuestra, por un lado, la presencia de TNFR1 en corteza cerebral de animales control y, por otro lado, que 24h después del PCI se produce un aumento de este receptor. En estudios anteriores se ha observado que la inmunorreactividad de TNFR1 aparece entre 4-6 horas después de una isquemia focal permanente (Botchkina et al., 1997) o entre 2-8 horas después de una isquemia global transitoria (Sairanen et al., 2001), observándose este receptor a tiempos muy tempranos. En cuanto a los análisis realizados para TNFR2, al no detectar ninguna banda inmunopositiva en los western blots, centramos nuestro trabajo en TNFR1. Una de las causas que posiblemente no nos ha permitido detectar TNFR2 pudo ser la baja sensibilidad de nuestro sistema de análisis, ya que existen algunos trabajos en donde se ha demostrado la expresión de este receptor por otras técnicas tras isquemia cerebral (mediante PCR; Lambertsen et al., 2007). Otra posible causa que explicaría esta ausencia, pudo ser el análisis de este receptor a tiempos tempranos después del PCI, ya que en otros estudios se ha observado que la expresión de TNFR2 después de una isquemia aparece retrasada con respecto a la de TNFR1 (Botchkina et al., 1997; Lambertsen et al., 2007). En cualquier caso, podría suceder que en situaciones de PCI, al contrario que en isquemia, el TNFR2 no aumente su expresión.

Volviendo a TNFR1, nuestras observaciones también demuestran que el aumento de expresión de TNFR1 se reduce cuando se inhibe selectivamente la actividad TACE mediante el compuesto BB1101, y con la inhibición de TNF- α , mediante un anticuerpo que neutraliza esta citoquina. Esto indicaría que la actividad TACE podría ser responsable del aumento de expresión de TNFR1 producido tras el PCI, aunque no descartamos otros mecanismos indirectos. Los compuestos derivados del ácido hidroxámico, como el BB1101, son inhibidores de TACE con una alta selectividad, un hecho importante que ha sido utilizado para distinguir entre la acción de TACE y la de otras proteasas (Parvathy et al., 1998; Hooper et al., 2000). Como se ha indicado antes, en resultados previos demostramos que la regulación a la alta de TACE después del PCI produce un aumento de la liberación de TNF- α , sucesos implicados en

la tolerancia hallada en este modelo experimental (Cárdenas et al., 2002). Nuestros resultados, también sugieren que TNF- α es responsable del aumento de expresión de su propio receptor en este contexto. Estas afirmaciones se ven respaldadas por datos obtenidos por otros autores, en los que se observa un aumento en la expresión de TNF- α y seguidamente un aumento en sus receptores tras la isquemia (Rosenzweig et al., 2007; Lambertsen et al., 2007).

En lo referente a la localización celular de TNFR1, en animales control no hemos observado inmunorreactividad para este receptor en neuronas, astrocitos y microglía. El motivo por el que se haya detectado expresión de TNFR1 por western en el grupo control y no en la doble inmunofluorescencia, puede deberse a diferencias de sensibilidad entre ambas técnicas. Por el contrario, el PCI produjo un aumento de la inmunorreactividad de TNFR1 únicamente en neuronas, detectándose este receptor en el área de la membrana, que es el lugar donde se une a TNF- α y transduce esta señal al interior celular. De nuevo, no existía información sobre la localización celular de TNFR1 después del PCI; sí que hay evidencias en isquemia, donde el aumento de este receptor se produce en neuronas, macrófagos activados y células endoteliales (Sairanen et al., 2001), habiéndose descrito los mismos resultados tras un proceso isquémico en el hombre (Dziewulska y Mossakowski, 2003).

Como se puede ver, tanto en la bibliografía existente como en nuestros resultados, tras el PCI no sólo se produce un aumento de la inmunorreactividad de TACE en neuronas, astrocitos y microglía, sino que también aparece un aumento de TNF- α en estas mismas células (para revisión ver Hallenbeck, 2002). Entonces podemos sugerir que puede tener lugar tanto un mecanismo autocrino como paracrino que sea el responsable del aumento de expresión de TNFR1, fenómeno que ocurre sobre todo en neuronas.

En este contexto, los resultados que aparecen en nuestro trabajo, y apoyándonos en resultados anteriores, demuestran que TACE induce la liberación de TNF- α y ambos sucesos provocarían el aumento en la expresión de TNFR1, participando todo ello en el desarrollo de TI, debido a que el tratamiento con BB1101, con anti-TNF- α y con ODN-antisentido de TNFR1 inhibe la reducción del volumen de infarto causado por el PCI.

I.e) Papel del factor nuclear κ B en la TI

Existen fuertes evidencias que apuntan a que el factor nuclear κ B (NF- κ B) es el responsable final de las acciones protectoras de TNF- α (para revisión ver Mattson et al., 2000) pero, hasta el momento, estos mecanismos no están bien establecidos. En este trabajo se demuestra que el efecto neuroprotector de TACE se produce a través de la activación de NF- κ B, previa liberación de TNF- α y su unión a TNFR1. Algunos resultados apoyan esta afirmación: en primer lugar, la inhibición de TACE por BB1101 previene no sólo la liberación de TNF- α , la regulación a la alta de TNFR1 y la neuroprotección, sino también la traslocación de NF- κ B al núcleo. En segundo lugar, el tratamiento con ODN-antisentido de TNFR1 pero no con el ODN-mismatch para este receptor, es capaz de reducir el aumento de este TNFR1 inducido por el PCI e inhibe también la translocación al núcleo de p65 (uno de los componentes de NF- κ B) y por tanto el efecto neuroprotector que se consigue con el PCI. La inhibición es parcial en ambos casos, por lo que no podemos descartar que existan otros mecanismos implicados en esta neuroprotección. En este sentido, existen algunos trabajos que apoyan nuestros resultados, como por ejemplo: estudios que demuestran la activación de NF- κ B vía TNFR1 (Adam et al., 1995; Liu et al., 1996) y también otros trabajos que describen la activación de este factor de transcripción tras la inducción de TNF- α dentro de la tolerancia isquémica (Ginis et al., 2002). Por último, el tratamiento con el inhibidor específico del proteasoma, lactacistina, produce no sólo la inhibición de la translocación al núcleo de p65, sino que también bloquea parcialmente el efecto protector inducido por el PCI, lo cual da peso a nuestras conclusiones.

En cuanto al efecto neuroprotector al que conduce la activación de NF- κ B, se han postulado distintos mecanismos, como por ejemplo el efecto de este factor sobre la inhibición de la apoptosis derivada de TNF- α (Liu et al., 1996) mediante el aumento de la expresión de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o la disminución de la proteína proapoptótica caspasa-3, ambos eventos demostrados tras el PCI (Qi et al., 2001; Park et al., 2002). Sin embargo, no podemos descartar otros mecanismos diferentes a éste que contribuyan a la neuroprotección generada por la vía TACE/TNF- α . Es bien conocido el papel dual (daño/protección) que tienen algunas moléculas como son TNF- α y NF-

κ B, que intervienen en la inducción de mediadores proinflamatorios e inflamatorios tras la isquemia, como son iNOS, COX-2, MMPs, etc... (para revisión ver Mattson et al., 2000). De hecho, en nuestros resultados se observa que lactacistina, por sí misma, posee ciertos efectos beneficiosos en la isquemia letal posiblemente por bloqueo de estas rutas que causan daño y que se activan tras la isquemia experimental. En concreto, tras el tratamiento con lactacistina en los animales sin PCI aparece un volumen de infarto inferior al grupo no tratado con este inhibidor del proteasoma. Por el contrario, tras el PCI, este inhibidor de NF- κ B hace que se pierda la TI desarrollada tras esta isquemia transitoria y no letal, quedando demostrado el papel dual de NF- κ B en la enfermedad cerebrovascular experimental.

I.f) Implicación de los transportadores de glutamato en la TI

Como se ha indicado en diferentes apartados, los transportadores de glutamato son unas proteínas encargadas de recaptar el glutamato del espacio extracelular, para así, poner fin a la transmisión glutamatérgica (Takahashi et al., 1997; Maragakis y Rothstein, 2001). Por esta función, constituyen una diana importante en los procesos de neuroprotección, siendo el motivo que nos ha impulsado a estudiar su implicación en la TI.

En esta tesis doctoral hemos demostrado que el PCI *in vivo* produce un aumento en la expresión de los transportadores de glutamato EAAT2 (glial) y EAAT3 (neuronal), y que el aumento de EAAT3 está mediado en parte por la vía TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B.

Es bien conocido el papel del glutamato en la fisiopatología del *ictus* isquémico. Este aminoácido se libera a altas concentraciones en el *core* y en la penumbra isquémicos, donde sobreactiva a sus receptores, lo que conduce a un aumento excesivo de Ca^{2+} intracelular que activa una gran variedad de procesos catabólicos y que finalmente conducirán a la muerte celular (Choi and Rothman, 1990; Castillo et al., 1996). Por el contrario, en el contexto de la TI, poco se conoce a cerca de su papel en modelos de PCI, siendo entonces necesario su estudio.

De los transportadores de glutamato se conoce, de entre otras muchas cosas, que están localizados tanto en neuronas como en células de la glía.

Hasta la fecha, se han descrito cinco subtipos de transportadores de glutamato en mamíferos (Seal y Amara, 1999): EAAT1/GLAST y EAAT2/GLT-1, localizados principalmente en la glía, EAAT3/EAAC1 y EAAT4, localizados y distribuidos a lo largo de la membrana neuronal y EAAT5, que aparece únicamente en retina.

Datos de nuestro laboratorio sobre la expresión de estos transportadores habían demostrado que el PCI *in vitro* únicamente induce un aumento para EAAT2 y 3, no viéndose modificada la expresión de EAAT1 (Romera et al., 2004). Estas observaciones se confirman en nuestros resultados. En primer lugar, la expresión de EAAT3 en el grupo control apareció en neuronas de todo el cerebro, tanto en membrana como en citoplasma. El PCI, tanto en los análisis por western blot como por doble inmunofluorescencia, produce un aumento de la inmunorreactividad para EAAT3 en neuronas situadas en la zona que rodea el área preconditionada. Es importante indicar que este aumento se produce sobre todo en la membrana neuronal, siendo desde este sitio, donde EAAT3 ejerce su función como transportador de glutamato (para revisión ver Rothstein et al., 1994; Chaudhry et al., 1995; Dehnes et al., 1998) y sería desde ahí donde intervendría en el desarrollo de TI. En este sentido se ha demostrado un aumento tanto en la expresión de EAAT3 en la membrana celular como un aumento de su actividad en la neuroprotección causada por la exposición a isoflurano (Huang y Zuo, 2005). El aumento de EAAT3 causado por el PCI se ve disminuido por la administración del inhibidor de la actividad TACE, BB1101, por el anticuerpo anti-TNF- α , por el tratamiento con ODN-antisentido de TNFR1 y por la administración de Lactacistina, inhibidor de la activación de NF- κ B. Esta disminución se observa tanto en el citoplasma como en la membrana plasmática.

En un análisis informático del promotor de EAAT3 realizado por nuestro grupo de trabajo, se observó que existían secuencias consenso de unión de NF- κ B a este promotor, lo que nos indica que, posiblemente este factor de transcripción regula, en parte, la expresión de EAAT3. De hecho, la inhibición de NF- κ B por lactacistina tras el PCI, unido a la disminución de EAAT3 tras esta inhibición, nos indica que la regulación de este transportador de glutamato en el PCI, es en parte, NF- κ B dependiente.

En lo que concierne a EAAT3, podemos afirmar que nuestros resultados de expresión y localización celular de este transportador están en concordancia con lo existente en la bibliografía, donde se demuestra la presencia de EAAT3 en neuronas de todo el cerebro, pero sobre todo en las membranas neuronales pre y postsinápticas, en el citoplasma y en las espinas dendríticas neuronales de hipocampo, córtex, cerebelo y ganglios basales (Rothstein et al., 1994; Fairman et al., 1995; Furuta et al., 1997b; He et al., 2000; He et al., 2001). También confirman los obtenidos previamente *in vitro* (Romera et al., 2004), y que el PCI, tanto *in vitro* como *in vivo*, produce un aumento en la expresión de EAAT3, aumento del que es responsable en parte la activación de la vía TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B.

Como se ha indicado antes, los transportadores gliales EAAT1 y EAAT2 aparecen expresados en cerebros de animales control, pero únicamente la expresión de EAAT2 aumenta tras el PCI. Este aumento, como veremos más adelante, se ha relacionado también con la TI que se produce tras el PCI. Por diferentes trabajos, EAAT2 se ha considerado como el principal transportador de glutamato implicado en la recaptación de casi todo este neurotransmisor en la corteza cerebral (Rothstein et al., 1996; Robinson, 1998). En este sentido, se ha observado que la disminución de EAAT2 mediante estrategias de inhibición por antisentidos o por delección génica, está relacionada con un aumento extracelular de glutamato, con daño neuronal y edema cerebral después de la isquemia experimental (Rothstein et al., 1996; Rao et al., 2001; Hamann et al., 2002; Namura et al., 2002), lo que sugiere que la estimulación de EAAT2 podría utilizarse para prevenir o mejorar el daño neuronal producido tras la isquemia. De hecho, recientemente hemos demostrado que la neuroprotección por CDP-colina se debe, en parte, a que favorece la translocación de este transportador desde el citosol a la membrana plasmática, donde es activo funcionalmente, y desde donde ayuda a la eliminación de los altos niveles extracelulares de glutamato tras la isquemia experimental (Hurtado et al., 2005; Hurtado et al., 2008). También nuestro grupo ha detectado un polimorfismo en la población en el promotor del gen de EAAT2, por el cual desaparece una secuencia de unión para GCF2 y cambia a una secuencia para AP-2, haciendo más susceptible al paciente de *ictus* al daño por excitotoxicidad (Mallolas et al., 2006). Además, se ha demostrado que los antibióticos β -lactámicos inducen

neuroprotección tras la isquemia porque aumentan la expresión de este transportador (Rothstein et al., 2005). Otros resultados han demostrado también que los β -lactámicos se han empleado como evento preconditionador, y tras una isquemia grave producen tolerancia isquémica mediante el aumento de la expresión de EAAT2 (Chu et al., 2007). Coincidiendo con todas estas observaciones, nuestros resultados muestran que el PCI produce un aumento de EAAT2, expresión que no responde a la activación de la vía TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B. Recientemente hemos demostrado en experimentos de preconditionamiento isquémico *in vitro*, que el aumento de expresión de EAAT2 se debe a la activación del receptor activado por proliferadores de peroxisomas γ (PPAR γ). Estos receptores, cuando se unen a sus ligandos correspondientes, actúan como factores de transcripción, regulando la expresión de sus genes diana, siendo uno de ellos el gen de EAAT2 (Romera et al., 2007).

En la literatura, existen evidencias que indican que TNF- α inhibe los sistemas de recaptación de glutamato en cultivos de astrocitos por mecanismos que operan a nivel post-traducciona (Ye y Sontheimer, 1996; Fine et al., 1996; Szymocha et al., 2000). Por el contrario, evidencias recientes apuntan a que TNF- α aumenta la expresión de EAAT2 y la recaptación de glutamato después de la administración de LPS (Persson et al., 2005), evento que parece no suceder en el PCI.

Aunque los transportadores de glutamato en principio tienen un papel neuroprotector, en condiciones de isquemia algunos de ellos se revierten, liberando glutamato al medio extracelular y contribuyendo al daño excitotóxico (Jabaudon et al., 2000; Rossi et al., 2000). Podría decirse entonces que un aumento en la expresión de los transportadores tendría efectos deletéreos. Sin embargo, aunque no está claro qué subtipo de transportador se revierte tras isquemia, existen indicios que apuntan a que ni EAAT3 ni EAAT2 intervienen en estos fenómenos de liberación de glutamato (Roettger y Lipton, 1996; Rossi et al., 2000; Rao et al., 2001).

En resumen dentro del bloque I, nuestros datos muestran que el PCI *in vivo* aumenta la expresión de TACE, la liberación de TNF- α , la expresión de TNFR1 y la activación de NF- κ B, eventos que intervienen en el desarrollo de

TI. Por otro lado, el PCI también favorece la expresión de los transportadores de glutamato EAAT2 (glial) y EAAT3 (neuronal), viéndose únicamente la expresión de este último regulada por la activación de la vía TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B. También se demuestra que la expresión de EAAT3 tras esta isquemia transitoria, aumenta en la superficie celular, lugar donde es funcionalmente activo.

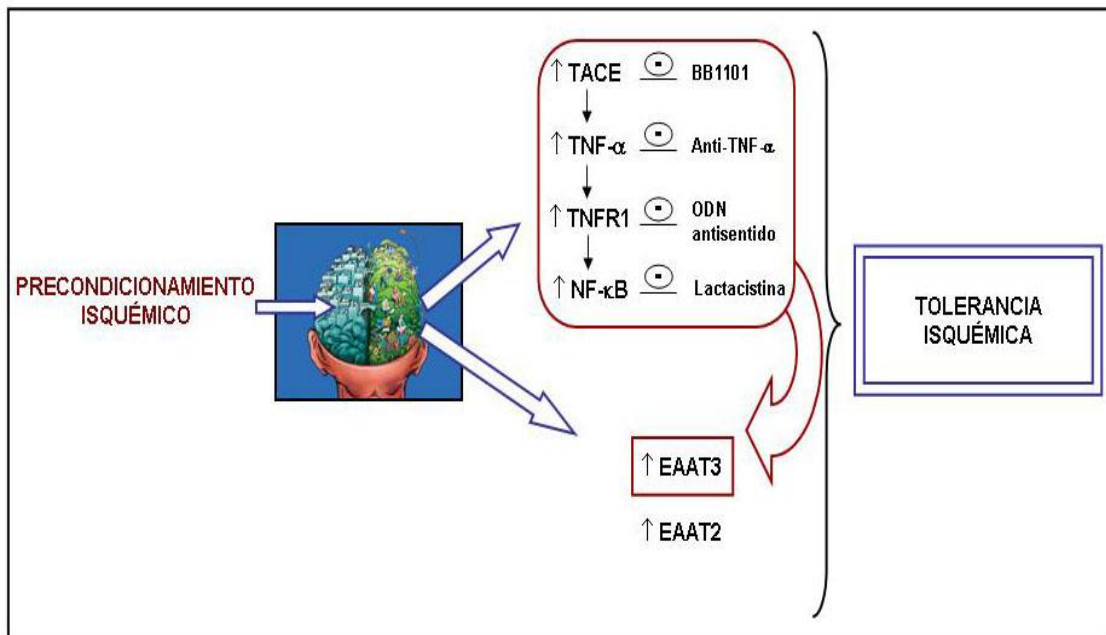


Figura 5.1: Vías de neuroprotección en la TI.

- BLOQUE II: TLR4 media la TI a través de mecanismos inflamatorios y a través de la activación de NF- κ B.

Como se ha indicado antes, dentro de la TI se pueden distinguir dos fases, la tolerancia temprana y la tardía, siendo necesaria en esta última la síntesis de nuevas proteínas. Por múltiples trabajos, incluidos los resultados que se presentan en esta tesis doctoral, se ha observado que el componente inflamatorio es muy importante para el desarrollo tanto de la tolerancia temprana como de la tardía (Liu et al., 2000; Schroeter et al., 2003; Romera et al., 2004). Dentro de éste componente inflamatorio, recientemente se ha implicado a los receptores Toll-like. Estos receptores reconocen sustancias derivadas de patógenos (PAMPs) o sustancias endógenas procedentes del daño tisular (DAMPs) y desencadenan la producción y liberación de diferentes citoquinas y proteínas de naturaleza inflamatoria, mediadores cuya función es, en principio, la defensa del tejido (Medzhitov, 2001; Lee and Lee, 2002). El SNC es capaz de responder ante cualquier daño exógeno (infecciones) o endógeno (isquemia cerebral, traumatismos) con una respuesta inmune de tipo innata, y se sabe que durante estos fenómenos se liberan diferentes ligandos de los TLRs, siendo lícito pensar que estos receptores podrían tener un papel importante en la isquemia y el preconditionamiento isquémico cerebrales. En este sentido, recientemente nuestro grupo de trabajo ha demostrado el papel de TLR4, uno de los receptores toll-like, en la isquemia cerebral (Caso et al., 2007). En estos estudios, se observó que TLR4 participa en el daño cerebral tras isquemia (empeorando tanto el volumen de infarto como los déficits motores) y en la expresión de mediadores inflamatorios, como iNOS, COX2 y MMP9, mediadores que en definitiva participan del daño producido tras un *ictus*.

II.a) Implicación de TLR4 en la TI

Teniendo en cuenta estos antecedentes, se analizó el papel de TLR4, esta vez en el preconditionamiento isquémico cerebral en un modelo *in vivo* realizado en ratón. Por nuestros resultados, podemos afirmar, en primer lugar, que el modelo de PCI empleado (6 min de oclusión de ambas carótidas; Wu et al., 2001) en los ratones control (C57BL/ScSn) produce una reducción del

volumen de infarto del 60,8% y una mejoría de los déficits motores tras la oclusión permanente de la MCA (Lambertsen et al., 2005), respecto del grupo sometido a isquemia sin preconditionamiento previo. El PCI también produce una reducción del volumen de infarto y una mejoría de los déficits motores en los animales deficientes en TLR4 (C57BL/ScNJ) respecto a su grupo sometido a isquemia y sin PCI. En estos animales, la disminución del volumen de infarto es únicamente del 18%, pudiendo afirmar, en segundo lugar, que TLR4 tras el PCI participa en la disminución del volumen de infarto, en la mejoría obtenida en los déficits motores y, en definitiva, en el desarrollo de TI.

Aunque en la bibliografía no existen evidencias previas que impliquen directamente a este receptor en la TI, hay datos que sugieren el papel de TLR4 en este tema. Como se indicó en la introducción, en función del estímulo predondicionante se pueden distinguir diferentes tipos de TI. Una de ellas, y de la que existe bastante conocimiento, es la tolerancia endotóxica o a LPS. Se sabe que este componente de la pared de bacterias Gram negativas, si se administra a bajas dosis, puede producir tolerancia frente a una isquemia cerebral posterior (Tasaki et al., 1997). En el desarrollo de este tipo de tolerancia se ha observado que intervienen las mismas citoquinas (TNF- α , IL-1 β , IL6) que en el caso de que el estímulo preconditionante fuese una isquemia de corta duración (Bordet et al., 2000). También se ha demostrado que el LPS es uno de los ligandos exógenos de TLR4 (Medzhitov, 2001; Lee y Lee, 2002; Akira y Takeda, 2004), el cual, cuando se activa por este ligando, induce la activación y liberación de una serie de citoquinas y factores de transcripción que han demostrado tener un papel en la TI (para revisión ver Kariko et al., 2004). Se conocen también otros ligandos endógenos para este receptor, algunos de los cuales están implicados en el desarrollo de TI. Este es el caso de algunas proteínas de estrés térmico o Hsps, como la Hsp60 y Hsp70 (Ohashi et al., 2000; Mollen et al., 2006). Existen múltiples trabajos experimentales en roedores y en humanos que han demostrado la implicación de estas proteínas en la TI por sus acciones en la renaturalización de proteínas, degradación de proteínas ya dañadas, etc (Turman et al., 1997; Kato et al., 2005; Omata et al., 2006). Por tanto nuestros resultados sugieren que estas moléculas actuarían a través de la activación de TLR4, apoyando nuestros datos sobre la implicación de este receptor en la TI.

II.b) Mecanismos dependientes de TLR4 implicados en la TI

La activación de TLR4 por sus ligandos (endógenos o exógenos) produce la activación de una serie de vías que convergen en la activación de diferentes factores de transcripción, siendo uno de ellos NF- κ B. Este factor de transcripción va a producir el aumento en la expresión de citoquinas (TNF- α , IL-1 β) y proteínas de carácter pro-inflamatorio (iNOS, COX2, MMP9; Nguyen et al., 2002; Lee y Lee, 2002; Akira y Takeda, 2004), mediadores implicados tanto en el daño cerebral tras la isquemia como en el desarrollo de TI. En este sentido en nuestros resultados se observa que tras el PCI, en los animales que poseen TLR4 se produce un mayor aumento en la activación de NF- κ B (mayor presencia de p65 en núcleo o disminución de su proteína represora en citoplasma, I κ B α ; figura 4.18) que en los animales TLR4 deficientes. Existen muchas evidencias que muestran una activación de este factor de transcripción tras el PCI y su participación en el desarrollo de TI (Blondeau et al., 2001). Entonces y en concordancia con lo explicado en cuanto a la señalización por TLR4, podemos afirmar que tras el PCI se produce la activación de TLR4 y, con ello, el aumento en la translocación de NF- κ B al núcleo celular, procesos implicados en el desarrollo de TI.

En cuanto a la expresión de proteínas pro-inflamatorias después del PCI, nuestros resultados muestran que los animales control (que expresan TLR4), además de desarrollar una mayor TI, expresan mayores cantidades de iNOS, COX-2 y MMP9, en comparación con los animales que carecen de este receptor. Existen muchas evidencias que explican el papel de iNOS, COX2 y MMP9 en el daño que se produce tras el *ictus* isquémico. iNOS es la forma inducible de las sintasas de NO y se expresa en la isquemia por la acción de NF- κ B. iNOS, en estas condiciones, va a producir altas cantidades de NO, el cual reaccionará con otras especies reactivas de oxígeno, produciendo efectos nocivos como inhibición de las sintasas de ATP, daño en el ADN, daños por oxidación de diferentes componentes de la membrana plasmática, etc... (Zhang et al., 1994). Por el contrario, también se ha demostrado que su síntesis y acción es necesaria para el desarrollo de TI tras el PCI. De esta forma, se ha observado que iNOS es imprescindible en los modelos de TI inducida por LPS (Kunz et al., 2007). Otro ejemplo de la participación de iNOS en la TI, aparece

en el trabajo realizado por Kawano y colaboradores en 2007, en donde se demuestra que la inhibición de iNOS por aminoguanidina y el empleo de animales knock out para esta proteína, reducía de nuevo el desarrollo de TI, recuperándose con el empleo de un donador de NO (Kawano et al., 2007). También se ha demostrado que la tolerancia inducida por la preexposición a anestésicos volátiles, es iNOS dependiente (Kapinya et al., 2002). Por tanto, y según estas evidencias, podemos afirmar que tras la activación de TLR4 acaecida tras el PCI, se produce la activación de NF- κ B y un aumento de iNOS, eventos implicados en el desarrollo de TI.

Al igual que iNOS, COX2 es otra proteína cuyas acciones deletéreas durante la isquemia cerebral son bien conocidas. La actividad catalítica de esta proteína está asociada a la producción de radicales libres y prostanoïdes, y se ha demostrado que su inhibición produce una disminución del volumen de infarto en modelos de isquemia experimental, lo que indica su importancia en esta patología (para revisión ver Iadecola, 2004). Pero como sucede con iNOS, el papel de COX-2 en la TI es el opuesto y es muy importante para su desarrollo. Un ejemplo de esto aparece en el trabajo realizado por Kim y colaboradores en 2007, en donde demuestran que la TI tras el PCI *in vitro* es dependiente de la expresión y actividad de COX2, ya que la inhibición de la misma con NS-398, disminuía casi totalmente la protección desarrollada tras el PCI (Kim et al., 2007). En este sentido, existen varios trabajos que demuestran la participación de COX2 en la TI (Horiguchi et al., 2006; Choi et al., 2006). Por tanto teniendo en cuenta estas evidencias, y según nuestros resultados en donde se observa un aumento en la expresión de COX-2 tras el PCI en animales que expresan TLR4, podemos afirmar que esta proteína se ve aumentada tras la activación de TLR4 y que ambos participan en la TI.

Por último y como vimos en la introducción, la expresión y actividad de MMP9, una metaloproteasa de matriz, tras la isquemia cerebral tanto en animales como en el hombre, se ha implicado en el daño de la barrera hematoencefálica así como en la transformación hemorrágica que puede ocurrir tras esta patología (Montaner, 2006). También se ha observado que el aumento de esta proteína ocurre más tarde que, por ejemplo, la expresión de MMP2, atribuyéndole a MMP9 acciones deletéreas a más largo plazo (Rosenberg, 2002). Además tras el *ictus* se produce la liberación de multitud de

citoquinas (TNF- α , IL-1 β), activación de factores de transcripción (AP-1, NF- κ B), que van a contribuir al aumento y activación de esta metaloproteasa. En este sentido, resultados recientes de nuestro grupo de trabajo han demostrado que tras la isquemia experimental, la activación de TLR4 conduce a un aumento tanto en la expresión como en la actividad de MMP9, y todo ello relacionado con el daño tisular tras el ictus (Caso et al., 2007). Por el contrario, se conocen también sus acciones neuroprotectoras a largo plazo, como por ejemplo la participación en el remodelado del tejido, su ayuda en la neurogénesis (ayuda a migrar nuevas células para recuperar el tejido dañado), su contribución en la angiogénesis, etc., (para revisión ver Zlokovic, 2006).

Sin embargo y hasta el momento, no existen evidencias claras sobre el papel de MMP9 en la TI. En este sentido, nuestros resultados demuestran que después del PCI se produce un aumento en la expresión de la proforma de MMP9, no variando la expresión de la forma madura. El aumento de la pro-MMP9 es significativamente superior en los animales que expresan TLR4 respecto de los animales deficientes para este receptor. Datos existentes en la bibliografía indican que tras el PCI y una posterior isquemia grave se reduce la expresión de MMP9, disminuyendo de esta forma el daño sobre la barrera hematoencefálica (Zhang et al., 2006). También se ha observado en cultivo, que el PCI disminuye la MMP9 producida tras una isquemia grave, y que estas acciones son dependientes de Hsp70 (Lee et al., 2004). Hsp70 es una proteína de la que se sabe que, por su acción de chaperona, interviene en desarrollo de TI (Dirnagl et al., 2003). También se sabe que es uno de los ligandos endógenos derivados del daño tisular (DAMPs) de TLR4 (Medzhitov, 2001). Nuestros resultados indican un aumento de pro-MMP9 24 horas después del PCI y no después de una isquemia grave, siendo este aumento mayor en los animales que expresan TLR4 y que presentan un mayor desarrollo de TI, respecto a los animales deficientes en este receptor. Por este motivo se hace necesaria una investigación más exhaustiva sobre lo que ocurre con MMP9, con HSP70 (ligando endógeno de TLR4) en nuestro modelo de PCI, y su papel en la TI.

Como se ha indicado en diferentes apartados de la presente tesis, la activación de TLR4 conduce a su vez, a la activación de NF- κ B. Es bien

conocido que por la acción de este factor de transcripción se producen y liberan diferentes citoquinas, como por ejemplo TNF- α . En el apartado anterior hemos demostrado el papel importante de esta citoquina y toda su vía de señalización en la TI, siendo lícito pensar que podría existir alguna relación entre ambas vías, pudiendo ser consecuencia el aumento de TNF- α tras el PCI, de la activación de TLR4. Estas afirmaciones son conjeturas, haciéndose necesaria una exploración rigurosa de estos fenómenos en futuros experimentos.

En resumen, los resultados mostrados en este bloque II nos indican que tras el PCI tiene lugar la activación de TLR4 y de toda su vía de señalización (activación de NF- κ B, aumento en la expresión de iNOS, COX2 y pro-MMP9) eventos que además de contribuir a la reducción del volumen de infarto y a un mejor estado motor, participan en el desarrollo de TI (figura 5.2).

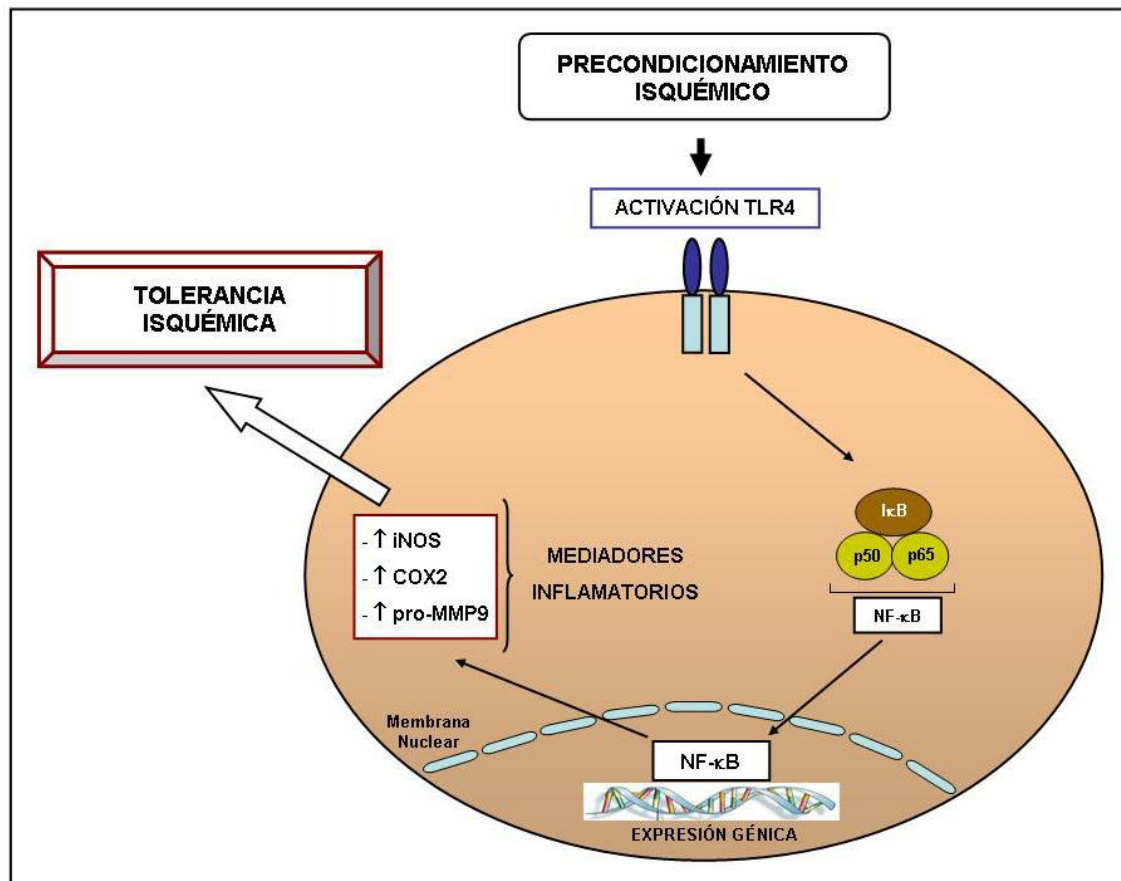


Figura 5.2: Mecanismos mediados por TLR4 tras el PCI.

6. CONCLUSIONS

- 1) We have developed several *in vivo* models of IPC, in rats and mice, that produce IT as demonstrated by a reduction in infarct volume and an improvement in neurological outcome.
- 2) IPC induces an upregulation of TACE protein in neurons, astrocytes, microglia and endothelial cells, being this upregulation more intense in plasma membrane, where this protein is active.
- 3) IPC promotes the expression of tumour necrosis factor receptor 1 (TNFR1), being this upregulation located in neuronal plasma membrane. Our results show that this upregulation is mediated by TACE/TNF- α pathway.
- 4) The activation of the TACE/TNF- α /TNFR1 pathway after IPC induces NF- κ B translocation to the nucleus. The inhibition of this pathway reduces the IPC-induced neuroprotective effect.
- 5) The inhibition of each step of the TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway reduces IPC-induced neuroprotective effects, demonstrating its pivotal role in IT.
- 6) IPC causes an upregulation of the neuronal excitatory aminoacid transporter EAAT3 in the neuronal plasma membrane, where this protein is active. More interestingly, our results show that EAAT3 upregulation in this setting is also mediated by TACE/TNF- α /TNFR1/ NF- κ B pathway.
- 7) EAAT2 but not EAAT1 is also upregulated after IPC. This overexpression is not mediated by TACE/TNF- α /TNFR1/ NF- κ B pathway.

- 8) The presence of TLR4 is associated to a reduction in infarct volume and a better neurological outcome after IPC. This receptor, involved in innate immunity, participates in IT.
- 9) IPC-induced TLR4 activation triggers NF- κ B translocation to the nucleus and upregulates NF- κ B target genes such as iNOS, COX-2 and MMP9, all of them known as inflammatory mediators implicated in IT.
- 10) Finally, our results strongly support the idea that the innate immune system, through TLR4, recruits different inflammatory mediators which are necessary to induce IT in the brain.

7. SUMMARY

1) INTRODUCTION

The brain is one of the most sensitive organs to injury in the entire body. A constant flow of blood to the brain is essential in delivering oxygen and glucose to neurons. If this flow is disrupted for even a short period of time, the result is cell damage or death. Stroke is the neurological evidence of a critical reduction of cerebral blood flow in a circumscribed part of the brain, resulting from the sudden or gradually progressing obstruction of a large brain artery. Causes of stroke can be divided into two main categories, haemorrhage and ischemia (Caplan, 1993). Haemorrhage describes a rupture of a blood vessel within the brain, which leads to leakage of blood into the brain cavity and causes damage to the brain. In ischemia, damage to the brain is caused by a reduction or complete blockade of blood flow to parts of the brain, resulting in glucose and oxygen deficiency. Stroke is the second to third leading cause of death and the main cause of severe, long-term disability in adults. However, treatment is almost reduced to fibrinolysis, a therapy useful in a low percentage of patients. Given that the immediate treatment for stroke is often unfeasible in the clinical setting, the need for new therapy strategies is imperative.

Recently, a significant amount of attention has been focused on the phenomenon of ischemic tolerance, also known as ischemic preconditioning. The IPC is a short ischemic event (ischemic preconditioning, IPC) that results in a subsequent resistance to severe ischemic injury (ischemic tolerance (IT); Kitagawa et al., 1990). This phenomenon has been described in several organs, especially heart and brain. Ischemic tolerance has also been shown in human clinical practice; indeed, less severe strokes have been described in patients with prior ipsilateral transient ischemic attacks (TIA) within a short period of time (Weih et al., 1999; Moncayo et al., 2000).

Several mechanisms of induction and maintenance of tolerance in the brain have been described (for a review, see Dirnagl et al., 2003): induction of heat shock proteins (Kirino et al., 1991), NMDA receptors (Kato et al., 1992;

Kasischke et al., 1996; Grabb and Choi, 1999), antiapoptotic factors (Shimazaki et al., 1994), interleukin-1 (Ohtsuki et al., 1996), adenosine receptors and ATP-dependent potassium channels (Heurteaux et al., 1995) and superoxide dismutase (Toyoda et al., 1997), but this phenomenon is not fully elucidated. The activation of transcription factors such as nuclear factor- κ B (NF- κ B) is an important mechanism implicated by several authors in the development of IT (Blondeau et al., 2001; Ginis et al., 2002). This factor plays a pivotal role in neuronal survival and is activated by various signals like proinflammatory cytokines, neurotrophic factors and neurotransmitters (for a review, see Mattson et al., 2000). One of these proinflammatory cytokines is tumor necrosis factor- α (TNF- α), which is expressed or released after brain ischemia (Liu et al., 1994). Tumor necrosis factor- α exerts its effects mainly on binding to different receptors, TNF receptor 1 (TNFR1; p55) and TNFR2 (p75), causing activation of complex signalling cascades that mediate different effects (for a review, see Baud and Karin, 2001). Although TNF- α contributes to ischemic brain damage, there are also multiple evidences supporting a neuroprotective role for this cytokine (for a review, see Shohami et al., 1999). Indeed, the expression of TNF- α and its neuroprotective role in vivo and in vitro models of IPC have been described (Wang et al., 2000; Liu et al., 2000) and we have shown that high plasma levels of TNF- α are associated with human cerebrovascular IT (Castillo et al., 2003). In addition, although the up-regulation of both TNF- α receptors after brain ischemia has been shown (Bruce et al., 1996; Botchkina et al., 1997), their role in IT is not known. Tumor necrosis factor- α is shed in its soluble form by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) called TNF- α convertase (TACE/ADAM17). Some roles of TACE in CNS have been demonstrated (for a review, see Moro et al., 2003). In this context, we have shown, using in vitro models, that TACE is up-regulated after ischemic brain damage (Hurtado et al., 2001; Hurtado et al., 2002) and that the up-regulation of TACE also occurs after in vivo IPC, where it is involved in brain tolerance (Cárdenas et al., 2002).

On the other hand, glutamate is known to play a predominant role in the pathogenesis of ischemic brain injury. This neurotransmitter is released after cerebral ischemia and produces cell death (Choi and Rothman, 1990; Castillo et

al., 1996). However, it has been reported that after IPC, the release of this excitatory amino acid is reduced (Johns et al., 2000; Grabb et al., 2002; Romera et al., 2004). Using an *in vitro* model of IT, we have shown that IPC produces an up-regulation of two glutamate transporters (EAAT2 and EAAT3) and that only EAAT3 up-regulation is partly mediated by TACE over-expression (Romera et al., 2004).

Finally, cerebral ischemia evokes a strong inflammatory response characterized by activation and release of cytokines, chemokines, adhesion molecules, and proteolytic enzymes that exacerbate tissue damage (del Zoppo et al., 2000; Emsley and Tyrrell, 2002) and may be also associated to the induction of IT (for a rev. see Dirnagl et al., 2003 and Kariko et al., 2004). Recently it has been demonstrated that the activation of the innate immunity takes place in the brain and utilizes toll-like receptors (TLRs; Medzhitov, 2001). Human TLR4 was the first characterized mammalian TLR (Medzhitov et al., 1997), but there are at least 10 distinct TLR family members (Medzhitov, 2001; Nguyen et al., 2002). Several observations, one of them made by our group, have shown that TLR4 is implicated in stroke (Caso et al., 2007). First, this receptor is expressed in microglia and astrocytes after inflammation in the central nervous system and after stroke (Lehnardt et al., 2002; Bowman et al., 2003). Second, exogenous and endogenous mediators that have been isolated after brain ischemia have been identified as ligands of TLR4 (Zuany-Amorim et al., 2002). Third, TLR4 activates nuclear factor κ B signalling pathways linked to the transcription of many proinflammatory genes that encode cytokines, chemokines, proteins of the complement system, enzymes such as inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and adhesion molecules (Medzhitov et al., 1997), events that have been also demonstrated in brain ischemia (Caso et al., 2007).

Therefore, we decided to investigate: a) mechanisms activated after the increase of TACE and TNF- α ., b) whether IPC induced glutamate transporters up-regulation takes also place *in vivo*., c) the cellular localization these glutamate transporters and the mechanisms by which this over-expression is controlled. These experiments have been made using an *in vivo* model of IPC in rats. d) In addition, we have explored the role of TLR4 in IT production, and the

inflammatory mediators produced by TLR4 signalling pathway after IPC, using an in vivo model in mice.

2) METHODS

Animals

Adult male Fischer rats (240 to 260 g) were used for the experiments of TACE/TNF- α pathway and the EAATs studies. C57BL/10ScNJ and C57BL/10ScSn mice were used for the studies of TLR4 and IT. The murine strain C57BL/10ScNJ do not express functional TLR4, they have a deletion in the TLR4 gene (Poltorak et al., 1998). The C57BL/10ScSn strain does not express the mutation and is considered as control groups. Animals were housed under standard conditions of temperature and humidity, with a 12-hour light/dark cycle and free access to food and water.

Ischemic Preconditioning and permanent Ischemia

The model of IPC used in rats was first described by Barone et al (1998) and consists in a period of 10 min of tMCAO as we described previously (Cárdenas et al., 2002). To evaluate the ability of IPC to produce IT, a focal permanent occlusion of the MCA was made 48h later (pMCAO, Brint et al., 1988; De Cristobal et al., 2001).

In mice, an occlusion period of 6 min of both common carotid arteries was used as IPC model (Wu et al., 2001). In order to study the effect of this global IPC in IT induction, a permanent occlusion of the MCA was made 48h later, as previously described (pMCAO, Lambertsen et al., 2005; Caso et al., 2007).

In both cases, the different blood vessels were exposed but not occluded in a group of animals, using these animals as control group (Sham group).

Infarct area determination and neurological characterization

All the brains were removed 24 hours after pMCAO. Series of 2mm (rats) or 1mm (mice) coronal brain slices were obtained (Brain Matrix, WPI-Europe, Aston, Stevenage, UK). Then the different slices were stained in 1% TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Merck) in 0.1 M phosphate buffer, and

infarct size was determined as described (Bederson et al., 1986a; Perez-Asensio et al., 2005).

Before euthanization, neurological deficits were measured as previously described (Hunter et al., 2000) according to a graded scoring system.

Western blot analysis

Protein extraction and nuclear extract for Western blot analyses was performed as described previously (Cárdenas et al., 2002). 24 hours after IPC brain cortex from the ipsilateral hemisphere was removed and homogenized by sonication. Samples containing 20 µg of protein were loaded and the proteins size-separated in 10-12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (90 mA). Proteins were blotted onto a PVDF membrane (Hybondt-P, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany) and incubated with specific primary antibodies against p65 (Santa Cruz; 1:1000 or 1:500), IκBα (Santa Cruz; 1:500), TNFR1 (Santa Cruz; 1:500), TNFR2 (Santa Cruz; 1:250); EAAT1/GLAST (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA; 1:500), EAAT2/GLT1 (Santa Cruz; 1:500) and EAAT3/ EAAC1 (Santa Cruz; 1:500), iNOS (Santa Cruz; 1:1000), COX2 (Santa Cruz; 1:1000) and MMP9 (Chemicon Int; 1:1000). Proteins recognized by the antibody were revealed by ECLTM-kit following manufacturer's instructions (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Germany). The results reflect data from six to eight different blots from different animals, and are expressed as relative absorbance units obtained by densitometric analysis after normalization for β-actin and Sp1 levels, which were used as loading controls for all the cytosolic and surface proteins and Sp1 for p65 proteins expression, respectively.

Double immunofluorescence

24 hours after IPC, rats were perfused through the left ventricle with sodium phosphate buffer (PB) as a vascular rinse followed by fixative solution containing 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer (PB), pH 7.4. The brains were removed, postfixed for 4 hours in the same solution of paraformaldehyde at room temperature, and then cryoprotected by immersion overnight at 4°C in 0.1 mol/L PB containing 30% sucrose. Brains were frozen

and serial 8-mm-thick frontal sections were cut with a Leitz sledge microtome. Sections were acetone-permeabilized for 10 min at 4°C and washed in PBS containing 3% bovine serum albumin and 0.1% Triton X-100 for 30 min; then sections were incubated in the two primary antibodies for each double staining 1 hour at room temperature: anti-TACE (Prosci; 1:10 dilution), anti-TNFR1 (Santa Cruz; 1:10 dilution) or anti-EAAT3 (Santa Cruz; 1:10 dilution) and a mouse antineuron nuclei (NeuN) antibody (Chemicon; 1:10 dilution) to identify neurons, anti-TACE, anti-TNFR1 and anti-EAAT3, and a mouse anti-GFAP antibody (Chemicon; 1:20 dilution) to identify astrocytes or anti-TACE or anti-TNFR1 and a fluorescein-labelled tomato lectin (from *Lycopersicon esculentum*; 1:150 dilution) to characterize microglia, macrophages and endothelium (Acarin et al., 1994). After washing in PBS, the sections were incubated in each respective secondary antibody for 1 hour. For TACE, TNFR1 and EAAT3, Cy3TM-labelled goat anti-rabbit IgG was used (Amersham; 1:10 dilution; red colour with fluorescence maximum at 670 nm); for NeuN and GFAP, the sections were incubated with Cy2TM-labelled goat anti-mouse IgG (Amersham; 1:10 dilution; green colour with fluorescence maximum at 506 nm). Visualization was performed under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse TE300, Nikon Corporation, Tokyo, Japan) using Plan Fluor x20/0.45 or x40/0.6 objectives, and phase optics, a B2A Nikon filter for FITC, and Cy2 fluorescence or a G2A Nikon filter for Cy3 fluorescence. The areas selected corresponded to regions in the proximity to the transiently occluded vessel, from both cortex and striatum. Each experiment was performed in duplicate and repeated three times. Image acquisition was performed with a laserscanning confocal imaging system (MRC1024, BioRad, Hempstead, UK).

Chemicals and Statistical Analyses

BB-1101(2S-allyl-N1-hydroxy-3R-isobutyl-N4-(1S-methylcarbamoyl-2-henylethyl)-succinamide) was kindly supplied by British Biotech (Redford et al, 1997; Kupatt et al, 1999) and administered subcutaneously at 10mg/Kg/day for 2 days. The antibody anti-TNF- α , TNFR1-antisense or mismatch ODNs and Lactacystin were purchased from Sigma-Genosys (UK) and administered by intracerebroventricular injections at different times in order to inhibit TNF- α ,

TNFR1 or NF- κ B activation. Results are expressed as mean \pm m.s.e. of the indicated number of experiments. Student's t-test or ANOVA followed by Dunnett's test (multiple comparisons versus a control) were used. A value of $P<0.05$ was considered statistically significant.

3) **RESULTS**

- Effect of Ischemic Preconditioning on TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway and its role on infarct volume and neurological status

Immunohistochemical studies revealed the presence of TACE in neurons, astrocytes and microglia in sham operated animals. The IPC produced an up-regulation of this protein, mainly in the surface of neurons (figure 4.2). These results and another previous, indicate that TACE activity is involved in IT (Cárdenas et al., 2002). By western blot analysis a TNFR1 immunopositive band in brains from sham-operated animals (figure 4.3), which was not different from unhandled animals (data not shown). IPC induced in these and in the double immunofluorescence analysis an increase in TNFR1 protein levels, 24 hours after this transient ischemia ($n=6$; $*P<0.05$; figures 4.3 and 4.4) which was maximal 48 hours after IPC (data not shown). Treatment with either BB-1101 or anti-TNF- α reduced IPC-induced up-regulation of TNFR1 ($n=6$; $\#P<0.05$; figure 4.3). TNFR2-immunopositive band was not detected in any group studied (data not shown). TNFR1-antisense ODN also reduced the over-expression of TNFR1 after IPC, effect not observed by TNFR1-mismatch (figures 4.3 and 4.4). Similar results were observed on NF- κ B activation studied by western blot. The IPC produced an up-regulation of p65 in the cellular nucleus, being this presence diminished by the inhibition of the TACE/TNF- α /TNFR1 pathway (figure 4.5).

Finally, our model of IPC produced a reduction on infarct volume (62%) and a better neurological outcome versus de Sham+pMCAO group. The inhibition of TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway reduced the benefits of the IPC on the IT production, indicating the important role of this pathway in IT mechanisms (figure 4.6).

- Effect of TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway on EAATs expression after IPC

Our western blot analysis revealed immunopositive bands for EAAT1, EAAT2 and EAAT3 in the brain cortex from control animals (sham operated group). The IPC, 24 hours after, produced an up-regulation of EAAT2 and EAAT3, and didn't modify the expression for EAAT1 (figures 4.8, 4.11 and 4.12).

The EAAT3 immunohistochemical study, showed that IPC induced the expression of this transporter mainly in the neuronal surface, where EAAT3 exerts its glutamate uptake actions (figure 4.9). Both western and immunohistochemical techniques, revealed that the inhibition of the TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway reduced the EAAT3 expression after IPC, showing the role of this pathway on its regulation (figure 4.8, 4.9 and 4.10). In contrast, the expression of EAAT2 in the treatment groups, didn't change after IPC, demonstrating that its regulation is not TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B pathway dependent (figure 4.12).

- Effect of TLR4 after IPC on NF- κ B activation, in the production of inflammatory mediators and in IT.

The IPC model used in mice revealed at first, that it could induce IT by a reduction on infarct volume and a better neurological outcome, in control animals (C57BL/ScSn; figure 4.13). In contrast, the reduction on infarct volume in the TLR4 knock out mice (C57BL/ScNJ, 18% of reduction) after IPC and a permanent ischemia, was less than the mice with TLR4 reduction (60%). These results show that TLR4 participates in the production of IT, and more interestingly is the role of innate immune respond in IPC (figure 4.14).

Our analysis by western blot of NF- κ B activation (measured by nuclear p65 or cytoplasmatic I κ B α) revealed an up-regulation of the nuclear p65 or a reduction of I κ B α in the cytoplasm in TLR4 expressing mice after IPC. In contrast, the NF- κ B activation in the knock out mice after IPC was less than in the positive group, showing that after IPC is important the NF- κ B activation for the induction of IT (figures 4.19 A and B). This transcriptional factor regulates

the expression of many inflammatory genes, including iNOS, COX2 and MMP9. Our studies of these proteins by western blot, showed an up-regulation of iNOS, COX2 and pro-MMP9 in the C57BL/ScSn mice (control mice) after IPC and, this up-regulation was higher than the up-regulation in the TLR4 knock out mice (C57BL/ScNJ; figures 4.16, 4.17 and 4.18). These results indicate that after IPC, the activation of NF- κ B happens through TLR4 and this effect produce the over-expression of different inflammatory mediators.

4) CONCLUSIONS

- This is the first report showing (1) that TNFR1 protein is up-regulated after IPC, (2) the cellular localization of TACE and TNFR1 in this setting, and (3) that the pathway TACE/TNF- α /TNFR1/NF- κ B is involved in IT. More interestingly, we have recently reported an association between IT and elevation of TNF- α concentrations in humans with acute stroke (Castillo et al., 2003).

- Related with the different EAATs expressions, our data show that *in vivo* IPC increases the expression of EAAT2/GLT-1 (glial transporter) and EAAT3/EAAC1 (neuronal transporter), an effect that might mediate IT. We also demonstrate that EAAT3 up-regulation is at least partially mediated by TACE/TNF- α /TNFR1 pathway and that EAAT3 is located in neurons mainly at the plasma membrane level, where it is functional.

- Finally, our results obtained in mice show that TLR4 contributes on the infarct volume reduction and better neurological outcome after IPC, data that indicate the role of TLR4 in IT. This receptor also induces the NF- κ B activation after IPC, transcription factor that produces an up-regulation of the iNOS, COX2 and pro-MMP9 expressions. All these inflammatory mediators produced in respond to TLR4 activation after IPC, are also implicated in the production of IT.

In summary, in our results we can see the beneficial effect of IPC. Thus, the elucidation of mechanisms that regulate the acquisition of brain tolerance could guide efforts to develop effective measures to protect the brain or reduce ischemic injury.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Aarts MM, Tymianski M (2003) Peptide action in stroke therapy. *Expert Opin Biol Ther* 3:1093-1104.
- Abumiya T, Lucero J, Heo JH, Tagaya M, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999) Activated microvessels express vascular endothelial growth factor and integrin $\alpha(v)\beta_3$ during focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:1038-1050.
- Acarin L, Vela JM, Gonzalez B, Castellano B (1994) Demonstration of poly-N-acetyl lactosamine residues in ameboid and ramified microglial cells in rat brain by tomato lectin binding. *J Histochem Cytochem* 42:1033-1041.
- Adam D, Kessler U, Kronke M (1995) Cross-linking of the p55 tumor necrosis factor receptor cytoplasmic domain by a dimeric ligand induces nuclear factor-kappa B and mediates cell death. *J Biol Chem* 270:17482-17487.
- Akira S, Takeda K (2004) Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4:499-511.
- Alvarez Sabin J, Alonso de Lecinana M, Gallego J, Gil-Peralta A, Casado I, Castillo J, Diez Tejedor E, Gil A, Jimenez C, Lago A, Martinez-Vila E, Ortega A, Rebollo M, Rubio F (2006) [Plan for stroke healthcare delivery]. *Neurologia* 21:717-726.
- Allen NJ, Karadottir R, Attwell D (2004) Reversal or reduction of glutamate and GABA transport in CNS pathology and therapy. *Pflugers Arch* 449:132-142.
- Amara SG, Fontana AC (2002) Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate. *Neurochem Int* 41:313-318.
- Ames A, 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G (1968) Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52:437-453.
- Ancuta P, Fahmi H, Pons JF, Le Blay K, Chaby R (1997) Involvement of the membrane form of tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced priming of mouse peritoneal macrophages for enhanced nitric oxide response to lipopolysaccharide. *Immunology* 92:259-266.
- Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1-14.

- Anderson KJ, Sandler DL (1993) Autoradiography of L-[3H]aspartate binding sites. *Life Sci* 52:863-868.
- Anderson KV, Jurgens G, Nusslein-Volhard C (1985) Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the Toll gene product. *Cell* 42:779-789.
- Aravalli RN, Peterson PK, Lokensgard JR (2007) Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol* 2:297-312.
- Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4155-4160.
- Aschner JL, Lum H, Fletcher PW, Malik AB (1997) Bradykinin- and thrombin-induced increases in endothelial permeability occur independently of phospholipase C but require protein kinase C activation. *J Cell Physiol* 173:387-396.
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L (1981) Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12:723-725.
- Back T (1998) Pathophysiology of the ischemic penumbra--revision of a concept. *Cell Mol Neurobiol* 18:621-638.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996) NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13-20.
- Barbe MF, Tytell M, Gower DJ, Welch WJ (1988) Hyperthermia protects against light damage in the rat retina. *Science* 241:1817-1820.
- Baron JC (2001) Mapping the ischaemic penumbra with PET: a new approach. *Brain* 124:2-4.
- Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ (1998) Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 29:1937-1950; discussion 1950-1931.
- Barone FC, Feuerstein GZ (1999) Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:819-834.
- Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-377.
- Bax DV, Messent AJ, Tart J, van Hoang M, Kott J, Maciewicz RA, Humphries MJ (2004) Integrin alpha5beta1 and ADAM-17 interact in vitro and co-localize in migrating HeLa cells. *J Biol Chem* 279:22377-22386.

- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM (1986a) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke* 17:1304-1308.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986b) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17:472-476.
- Berenbaum F (2004) COX-3: fact or fancy? *Joint Bone Spine* 71:451-453.
- Bergles DE, Tzingounis AV, Jahr CE (2002) Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J Neurosci* 22:10153-10162.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP (1997) A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385:729-733.
- Black RA (2002) Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol* 34:1-5.
- Blanco M, Lizasoain I, Sobrino T, Vivancos J, Castillo J (2006) Ischemic preconditioning: a novel target for neuroprotective therapy. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2:38-47.
- Blondeau N, Widmann C, Lazdunski M, Heurteaux C (2001) Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J Neurosci* 21:4668-4677.
- Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J (2002) The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* 27:19-26.
- Bordet R, Deplanque D, Maboudou P, Puisieux F, Pu Q, Robin E, Martin A, Bastide M, Leys D, Lhermitte M, Dupuis B (2000) Increase in endogenous brain superoxide dismutase as a potential mechanism of lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1190-1196.
- Bordi F, Ugolini A (1999) Group I metabotropic glutamate receptors: implications for brain diseases. *Prog Neurobiol* 59:55-79.
- Botchkina GI, Meistrell ME, 3rd, Botchkina IL, Tracey KJ (1997) Expression of TNF and TNF receptors (p55 and p75) in the rat brain after focal cerebral ischemia. *Mol Med* 3:765-781.

- Bottcher T, von Mering M, Ebert S, Meyding-Lamade U, Kuhnt U, Gerber J, Nau R (2003) Differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in experimental murine central nervous system infections. *Neurosci Lett* 344:17-20.
- Bowman CC, Rasley A, Tranguch SL, Marriott I (2003) Cultured astrocytes express toll-like receptors for bacterial products. *Glia* 43:281-291.
- Brint S, Jacewicz M, Kiessling M, Tanabe J, Pulsinelli W (1988) Focal brain ischemia in the rat: methods for reproducible neocortical infarction using tandem occlusion of the distal middle cerebral and ipsilateral common carotid arteries. *J Cereb Blood Flow Metab* 8:474-485.
- Bruce AJ, Boling W, Kindy MS, Peschon J, Kraemer PJ, Carpenter MK, Holtsberg FW, Mattson MP (1996) Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 2:788-794.
- Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U (1997) Induction of tolerance in rat cortical neurons: hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 414:117-121.
- Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM (2002) Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61:1013-1021.
- Burda J, Hrehorovska M, Bonilla LG, Danielisova V, Cizkova D, Burda R, Nemethova M, Fando JL, Salinas M (2003) Role of protein synthesis in the ischemic tolerance acquisition induced by transient forebrain ischemia in the rat. *Neurochem Res* 28:1213-1219.
- Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CL (2004) Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J Biol Chem* 279:34388-34396.
- Buxbaum JD, Liu KN, Luo Y, Slack JL, Stocking KL, Peschon JJ, Johnson RS, Castner BJ, Cerretti DP, Black RA (1998) Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor. *J Biol Chem* 273:27765-27767.
- Candelario-Jalil E, Gonzalez-Falcon A, Garcia-Cabrera M, Alvarez D, Al-Dalain S, Martinez G, Leon OS, Springer JE (2003) Assessment of the relative contribution of COX-1 and COX-2 isoforms to ischemia-induced oxidative damage and neurodegeneration following transient global cerebral ischemia. *J Neurochem* 86:545-555.

- Cao CX, Yang QW, Lv FL, Cui J, Fu HB, Wang JZ (2007) Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice. *Biochem Biophys Res Commun* 353:509-514.
- Caplan LR (2003) *Stroke. A clinical approach* 2ª edición. Ed. Boston: Butterworth-Heinemann; 1993. pp. 23-66.
- Cárdenas A, Moro MA, Leza JC, O'Shea E, Davalos A, Castillo J, Lorenzo P, Lizasoain I (2002) Upregulation of TACE/ADAM17 after ischemic preconditioning is involved in brain tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1297-1302.
- Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3666-3670.
- Casado M, Bendahan A, Zafra F, Danbolt NC, Aragon C, Gimenez C, Kanner BI (1993) Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C. *J Biol Chem* 268:27313-27317.
- Caso JR, Lizasoain I, Lorenzo P, Moro MA, Leza JC (2006) The role of tumor necrosis factor-alpha in stress-induced worsening of cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 142:59-69.
- Caso JR, Pradillo JM, Hurtado O, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I (2007) Toll-like receptor 4 is involved in brain damage and inflammation after experimental stroke. *Circulation* 115:1599-1608.
- Castellanos M, Leira R, Serena J, Pumar JM, Lizasoain I, Castillo J, Davalos A (2003) Plasma metalloproteinase-9 concentration predicts hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Stroke* 34:40-46.
- Castillo J, Davalos A, Naveiro J, Noya M (1996) Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke* 27:1060-1065.
- Castillo J (1999) [Biochemistry of cerebral ischemia]. *Neurologia* 14 Suppl 4:17-23.
- Castillo J (2000) [Physiopathology of cerebral ischemia]. *Rev Neurol* 30:459-464.
- Castillo J, Leira R (2001) Predictors of deteriorating cerebral infarct: role of inflammatory mechanisms. Would its early treatment be useful? *Cerebrovasc Dis* 11 Suppl 1:40-48.
- Castillo J, Moro MA, Blanco M, Leira R, Serena J, Lizasoain I, Davalos A (2003) The release of tumor necrosis factor-alpha is associated with ischemic tolerance in human stroke. *Ann Neurol* 54:811-819.

- Centeno JM, Orti M, Salom JB, Sick TJ, Perez-Pinzon MA (1999) Nitric oxide is involved in anoxic preconditioning neuroprotection in rat hippocampal slices. *Brain Res* 836:62-69.
- Clavien PA, Yadav S, Sindram D, Bentley RC (2000) Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 232:155-162.
- Cooper HK, Zalewska T, Kawakami S, Hossmann KA, Kleihues P (1977) Delayed inhibition of protein synthesis during recirculation after compression ischemia of the rat brain. *Acta Neurol Scand Suppl* 64:130-131.
- Correale J, Villa A (2004) The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries. *J Neurol* 251:1304-1316.
- Chan FK, Chun HJ, Zheng L, Siegel RM, Bui KL, Lenardo MJ (2000) A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science* 288:2351-2354.
- Chaudhry FA, Lehre KP, van Lookeren Campagne M, Ottersen OP, Danbolt NC, Storm-Mathisen J (1995) Glutamate transporters in glial plasma membranes: highly differentiated localizations revealed by quantitative ultrastructural immunocytochemistry. *Neuron* 15:711-720.
- Chen CC, Manning AM (1995) Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: a dominant role for NF-kappa B. *Agents Actions Suppl* 47:135-141.
- Chen S, Li G, Long L (1999) [Clinical research of ischemic preconditioning on lung protection]. *Hunan Yi Ke Da Xue Xue Bao* 24:357-359.
- Chen W, Aoki C, Mahadomrongkul V, Gruber CE, Wang GJ, Blitzblau R, Irwin N, Rosenberg PA (2002) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci* 22:2142-2152.
- Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 23:137-149.
- Cho S, Park EM, Zhou P, Frys K, Ross ME, Iadecola C (2005) Obligatory role of inducible nitric oxide synthase in ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:493-501.
- Choi DW (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 11:465-469.
- Choi DW, Rothman SM (1990) The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13:171-182.

- Choi JS, Kim HY, Chun MH, Chung JW, Lee MY (2006) Differential regulation of cyclooxygenase-2 in the rat hippocampus after cerebral ischemia and ischemic tolerance. *Neurosci Lett* 393:231-236.
- Chu K, Lee ST, Sinn DI, Ko SY, Kim EH, Kim JM, Kim SJ, Park DK, Jung KH, Song EC, Lee SK, Kim M, Roh JK (2007) Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke* 38:177-182.
- Dahl NA, Balfour WM (1964) Prolonged Anoxic Survival Due to Anoxia Pre-Exposure: Brain Atp, Lactate, and Pyruvate. *Am J Physiol* 207:452-456.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol* 65:1-105.
- Dawson VL, Dawson TM (1996) Free radicals and neuronal cell death. *Cell Death Differ* 3:71-78.
- De Cristobal J, Moro MA, Davalos A, Castillo J, Leza JC, Camarero J, Colado MI, Lorenzo P, Lizasoain I (2001) Neuroprotective effect of aspirin by inhibition of glutamate release after permanent focal cerebral ischaemia in rats. *J Neurochem* 79:456-459.
- De Cristobal J, Cardenas A, Lizasoain I, Leza JC, Fernandez-Tome P, Lorenzo P, Moro MA (2002) Inhibition of glutamate release via recovery of ATP levels accounts for a neuroprotective effect of aspirin in rat cortical neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Stroke* 33:261-267.
- Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC (1998) The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J Neurosci* 18:3606-3619.
- del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ (2000) Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10:95-112.
- Diaz JF, Kralicek A, Mingorance J, Palacios JM, Vicente M, Andreu JM (2001) Activation of cell division protein FtsZ. Control of switch loop T3 conformation by the nucleotide gamma-phosphate. *J Biol Chem* 276:17307-17315.
- Diez-Tejedor E, del Brutto O, Alvarez Sabin J, Munoz M, Abiusi G (2001) [Classification of the cerebrovascular diseases. Iberoamerican Cerebrovascular diseases Society]. *Rev Neurol* 33:455-464.

- Dirnagl U, Simon RP, Hallenbeck JM (2003) Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* 26:248-254.
- Dziewulska D, Mossakowski MJ (2003) Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. *Clin Neuropathol* 22:35-40.
- Emerich DF, Dean RL, 3rd, Bartus RT (2002) The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 173:168-181.
- Emsley HC, Tyrrell PJ (2002) Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1399-1419.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 375:599-603.
- Farooqui AA, Horrocks LA, Farooqui T (2007) Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* 101:577-599.
- Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol* 61:243-282.
- Fenteany G, Schreiber SL (1998) Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem* 273:8545-8548.
- Ferrer-Martinez A, Felipe A, Nicholson B, Casado J, Pastor-Anglada M, McGivan J (1995) Induction of the high-affinity Na(+)-dependent glutamate transport system XAG- by hypertonic stress in the renal epithelial cell line NBL-1. *Biochem J* 310 (Pt 2):689-692.
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998) The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5:143-159.
- Fine SM, Angel RA, Perry SW, Epstein LG, Rothstein JD, Dewhurst S, Gelbard HA (1996) Tumor necrosis factor alpha inhibits glutamate uptake by primary human astrocytes. Implications for pathogenesis of HIV-1 dementia. *J Biol Chem* 271:15303-15306.
- Fiorucci S, Antonelli E, Migliorati G, Santucci L, Morelli O, Federici B, Morelli A (1998) TNFalpha processing enzyme inhibitors prevent aspirin-induced TNFalpha release and protect against gastric mucosal injury in rats. *Aliment Pharmacol Ther* 12:1139-1153.
- Fornai F, Lenzi P, Gesi M, Ferrucci M, Lazzeri G, Busceti CL, Ruffoli R, Soldani P, Ruggieri S, Alessandri MG, Paparelli A (2003) Fine structure and biochemical mechanisms underlying nigrostriatal inclusions and cell death after proteasome inhibition. *J Neurosci* 23:8955-8966.

- Furuta A, Rothstein JD, Martin LJ (1997a) Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J Neurosci* 17:8363-8375.
- Furuta A, Martin LJ, Lin CL, Dykes-Hoberg M, Rothstein JD (1997b) Cellular and synaptic localization of the neuronal glutamate transporters excitatory amino acid transporter 3 and 4. *Neuroscience* 81:1031-1042.
- Gegelashvili G, Schousboe A (1997) High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity. *Mol Pharmacol* 52:6-15.
- Gidday JM, Shah AR, Maceren RG, Wang Q, Pelligrino DA, Holtzman DM, Park TS (1999) Nitric oxide mediates cerebral ischemic tolerance in a neonatal rat model of hypoxic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:331-340.
- Ginis I, Jaiswal R, Klimanis D, Liu J, Greenspon J, Hallenbeck JM (2002) TNF- α -induced tolerance to ischemic injury involves differential control of NF- κ B transactivation: the role of NF- κ B association with p300 adaptor. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:142-152.
- Goddard DR, Bunning RA, Woodroffe MN (2001) Astrocyte and endothelial cell expression of ADAM 17 (TACE) in adult human CNS. *Glia* 34:267-271.
- Grabb MC, Choi DW (1999) Ischemic tolerance in murine cortical cell culture: critical role for NMDA receptors. *J Neurosci* 19:1657-1662.
- Grabb MC, Lobner D, Turetsky DM, Choi DW (2002) Preconditioned resistance to oxygen-glucose deprivation-induced cortical neuronal death: alterations in vesicular GABA and glutamate release. *Neuroscience* 115:173-183.
- Grandati M, Verrecchia C, Revaud ML, Allix M, Boulu RG, Plotkine M (1997) Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br J Pharmacol* 122:625-630.
- Grisham MB, Palombella VJ, Elliott PJ, Conner EM, Brand S, Wong HL, Pien C, Mazzola LM, Destree A, Parent L, Adams J (1999) Inhibition of NF- κ B activation in vitro and in vivo: role of 26S proteasome. *Methods Enzymol* 300:345-363.
- Grunewald M, Kanner BI (2000). The accessibility of a novel reentrant loop of the glutamate transporter GLT-1 is restricted by its substrate. *J Biol Chem* 275:9684-9689.
- Hallenbeck JM (2002). The many faces of tumor necrosis factor in stroke. *Nat Med* 8:1363-1368.

- Hamann M, Rossi DJ, Marie H, Attwell D (2002) Knocking out the glial glutamate transporter GLT-1 reduces glutamate uptake but does not affect hippocampal glutamate dynamics in early simulated ischaemia. *Eur J Neurosci* 15:308-314.
- Hamman GF y del Zoppo GJ (2004) *Stroke. Pathophysiology, Diagnosis and Management* 4ª edición. Ed. Churchill livingstone; 48, 775-783.
- Hashimoto C, Hudson KL, Anderson KV (1988) The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* 52:269-279.
- He Y, Janssen WG, Rothstein JD, Morrison JH (2000) Differential synaptic localization of the glutamate transporter EAAC1 and glutamate receptor subunit GluR2 in the rat hippocampus. *J Comp Neurol* 418:255-269.
- He Y, Hof PR, Janssen WG, Rothstein JD, Morrison JH (2001) Differential synaptic localization of GluR2 and EAAC1 in the macaque monkey entorhinal cortex: a postembedding immunogold study. *Neurosci Lett* 311:161-164.
- Heiss WD, Graf R (1994). The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol* 7:11-19.
- Heiss WD, Kracht LW, Thiel A, Grond M, Pawlik G (2001) Penumbra probability thresholds of cortical flumazenil binding and blood flow predicting tissue outcome in patients with cerebral ischaemia. *Brain* 124:20-29.
- Heo JH, Lucero J, Abumiya T, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (1999) Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:624-633.
- Heurteaux C, Lauritzen I, Widmann C, Lazdunski M (1995) Essential role of adenosine, adenosine A1 receptors, and ATP-sensitive K⁺ channels in cerebral ischemic preconditioning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4666-4670.
- Hill HD, Straka JG (1988) Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. *Anal Biochem* 170:203-208.
- Hiraide T, Katsura K, Muramatsu H, Asano G, Katayama Y (2001) Adenosine receptor antagonists cancelled the ischemic tolerance phenomenon in gerbil. *Brain Res* 910:94-98.
- Hooper NM, Trew AJ, Parkin ET, Turner AJ (2000) The role of proteolysis in Alzheimer's disease. *Adv Exp Med Biol* 477:379-390.
- Horiguchi T, Snipes JA, Kis B, Shimizu K, Busija DW (2006) Cyclooxygenase-2 mediates the development of cortical spreading depression-induced

- tolerance to transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 140:723-730.
- Hosomi N, Lucero J, Heo JH, Koziol JA, Copeland BR, del Zoppo GJ (2001) Rapid differential endogenous plasminogen activator expression after acute middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 32:1341-1348.
 - Hu BR, Fux CM, Martone ME, Zivin JA, Ellisman MH (1999) Persistent phosphorylation of cyclic AMP responsive element-binding protein and activating transcription factor-2 transcription factors following transient cerebral ischemia in rat brain. *Neuroscience* 89:437-452.
 - Hu X (2003) Proteolytic signaling by TNF α : caspase activation and IkappaB degradation. *Cytokine* 21:286-294.
 - Hua F, Ma J, Ha T, Xia Y, Kelley J, Williams DL, Kao RL, Browder IW, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Li C (2007) Activation of Toll-like receptor 4 signaling contributes to hippocampal neuronal death following global cerebral ischemia/reperfusion. *J Neuroimmunol* 190:101-111.
 - Huang PL (2004) Nitric oxide and cerebral ischemic preconditioning. *Cell Calcium* 36:323-329.
 - Huang Y, Zuo Z (2005) Isoflurane induces a protein kinase C α -dependent increase in cell-surface protein level and activity of glutamate transporter type 3. *Mol Pharmacol* 67:1522-1533.
 - Huang YH, Bergles DE (2004) Glutamate transporters bring competition to the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 14:346-352.
 - Hunter AJ, Hatcher J, Virley D, Nelson P, Irving E, Hadingham SJ, Parsons AA (2000) Functional assessments in mice and rats after focal stroke. *Neuropharmacology* 39:806-816.
 - Hurtado O, Cardenas A, Lizasoain I, Bosca L, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2001) Up-regulation of TNF- α convertase (TACE/ADAM17) after oxygen-glucose deprivation in rat forebrain slices. *Neuropharmacology* 40:1094-1102.
 - Hurtado O, Lizasoain I, Fernandez-Tome P, Alvarez-Barrientos A, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2002) TACE/ADAM17-TNF- α pathway in rat cortical cultures after exposure to oxygen-glucose deprivation or glutamate. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:576-585.
 - Hurtado O, De Cristobal J, Sanchez V, Lizasoain I, Cardenas A, Pereira MP, Colado MI, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2003) Inhibition of glutamate release by delaying ATP fall accounts for neuroprotective effects of antioxidants in experimental stroke. *FASEB J* 17:2082-2084.
 - Hurtado O, Moro MA, Cardenas A, Sanchez V, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Davalos A, Castillo J, Lizasoain I

- (2005) Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis* 18:336-345.
- Hurtado O, Pradillo JM, Fernandez-Lopez D, Morales JR, Sobrino T, Castillo J, Alborch E, Moro MA, Lizasoain I (2008) Delayed post-ischemic administration of CDP-choline increases EAAT2 association to lipid rafts and affords neuroprotection in experimental stroke. *Neurobiol Dis* 29:123-131.
 - Iadecola C, Xu X, Zhang F, el-Fakahany EE, Ross ME (1995) Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 15:52-59.
 - Iadecola C (2004) Bone marrow spawns brain killers. *Nat Med* 10:1044-1045.
 - Jambaudon D, Scanziani M, Gahwiler BH, Gerber U (2000) Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5610-5615.
 - Janoff A (1964) Alterations in Lysosomes (Intracellular Enzymes) During Shock; Effects of Preconditioning (Tolerance) and Protective Drugs. *Int Anesthesiol Clin* 2:251-269.
 - Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV (1999) Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. *Science* 283:543-546.
 - Johns L, Sinclair AJ, Davies JA (2000) Hypoxia/hypoglycemia-induced amino acid release is decreased in vitro by preconditioning. *Biochem Biophys Res Commun* 276:134-136.
 - Jones NM, Bergeron M (2001) Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:1105-1114.
 - Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A (1993) The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke* 24:571-575; discussion 575-576.
 - Kanai Y, Hediger MA (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 360:467-471.
 - Kapinya KJ, Lowl D, Futterer C, Maurer M, Waschke KF, Isaev NK, Dirnagl U (2002) Tolerance against ischemic neuronal injury can be induced by volatile anesthetics and is inducible NO synthase dependent. *Stroke* 33:1889-1898.

- Kariko K, Weissman D, Welsh FA (2004) Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling--a unifying theme in ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 24:1288-1304.
- Kasischke K, Ludolph AC, Riepe MW (1996) NMDA-antagonists reverse increased hypoxic tolerance by preceding chemical hypoxia. *Neurosci Lett* 214:175-178.
- Kato H, Liu Y, Araki T, Kogure K (1992) MK-801, but not anisomycin, inhibits the induction of tolerance to ischemia in the gerbil hippocampus. *Neurosci Lett* 139:118-121.
- Kato H, Kogure K, Nakata N, Araki T, Itoyama Y (1995) Facilitated recovery from postischemic suppression of protein synthesis in the gerbil brain with ischemic tolerance. *Brain Res Bull* 36:205-208.
- Kato K, Shimazaki K, Kamiya T, Amemiya S, Inaba T, Oguro K, Katayama Y (2005) Differential effects of sublethal ischemia and chemical preconditioning with 3-nitropropionic acid on protein expression in gerbil hippocampus. *Life Sci* 77:2867-2878.
- Kawano T, Kunz A, Abe T, Girouard H, Anrather J, Zhou P, Iadecola C (2007) iNOS-derived NO and nox2-derived superoxide confer tolerance to excitotoxic brain injury through peroxynitrite. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1453-1462.
- Kerkerian L, Dusticier N, Nieoullon A (1987) Modulatory effect of dopamine on high-affinity glutamate uptake in the rat striatum. *J Neurochem* 48:1301-1306.
- Kim E, Raval AP, Defazio RA, Perez-Pinzon MA (2007) Ischemic preconditioning via epsilon protein kinase C activation requires cyclooxygenase-2 activation in vitro. *Neuroscience* 145:931-941.
- Kirino T, Tsujita Y, Tamura A (1991) Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 11:299-307.
- Kirino T (2002) Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:1283-1296.
- Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, Handa N, Fukunaga R, Kimura K, Mikoshiba K, et al. (1990) 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain Res* 528:21-24.
- Kunz A, Park L, Abe T, Gallo EF, Anrather J, Zhou P, Iadecola C (2007) Neurovascular protection by ischemic tolerance: role of nitric oxide and reactive oxygen species. *J Neurosci* 27:7083-7093.
- Kupatt C, Habazettl H, Goedecke A, Wolf DA, Zahler S, Boekstegers P, Kelly RA, Becker BF (1999) Tumor necrosis factor-alpha contributes to ischemia- and reperfusion-induced endothelial activation in isolated hearts. *Circ Res* 84:392-400.

- Lambertsen KL, Meldgaard M, Ladeby R, Finsen B (2005) A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 25:119-135.
- Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, Meldgaard M, Finsen B (2007) Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience* 144:934-949.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922-3927.
- Lee JE, Kim YJ, Kim JY, Lee WT, Yenari MA, Giffard RG (2004) The 70 kDa heat shock protein suppresses matrix metalloproteinases in astrocytes. *Neuroreport* 15:499-502.
- Lee SJ, Lee S (2002) Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 1:181-191.
- Lehnardt S, Lachance C, Patrizi S, Lefebvre S, Follett PL, Jensen FE, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2002) The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. *J Neurosci* 22:2478-2486.
- Lewerenz J, Klein M, Methner A (2006) Cooperative action of glutamate transporters and cystine/glutamate antiporter system Xc- protects from oxidative glutamate toxicity. *J Neurochem* 98:916-925.
- Lin YC, Chang YM, Yu JM, Yen JH, Chang JG, Hu CJ (2005) Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis* 180:305-309.
- Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D, Donnelly D (2007) Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience* 146:617-629.
- Lipton P (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79:1431-1568.
- Liu J, Ginis I, Spatz M, Hallenbeck JM (2000) Hypoxic preconditioning protects cultured neurons against hypoxic stress via TNF-alpha and ceramide. *Am J Physiol Cell Physiol* 278:C144-153.

- Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ (1994) Tumor necrosis factor- α expression in ischemic neurons. *Stroke* 25:1481-1488.
- Liu ZG, Hsu H, Goeddel DV, Karin M (1996) Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF- κ B activation prevents cell death. *Cell* 87:565-576.
- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001) The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104:487-501.
- Lucas DR, Newhouse JP (1957) The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 58:193-201.
- MacEwan DJ (2002) TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135:855-875.
- Madl JE, Burgesser K (1993) Adenosine triphosphate depletion reverses sodium-dependent, neuronal uptake of glutamate in rat hippocampal slices. *J Neurosci* 13:4429-4444.
- Madrigal JL, Hurtado O, Moro MA, Lizasoain I, Lorenzo P, Castrillo A, Bosca L, Leza JC (2002) The increase in TNF- α levels is implicated in NF- κ B activation and inducible nitric oxide synthase expression in brain cortex after immobilization stress. *Neuropsychopharmacology* 26:155-163.
- Mallolas J, Hurtado O, Castellanos M, Blanco M, Sobrino T, Serena J, Vivancos J, Castillo J, Lizasoain I, Moro MA, Davalos A (2006) A polymorphism in the EAAT2 promoter is associated with higher glutamate concentrations and higher frequency of progressing stroke. *J Exp Med* 203:711-717.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2001) Glutamate transporters in neurologic disease. *Arch Neurol* 58:365-370.
- Maragakis NJ, Rothstein JD (2004) Glutamate transporters: animal models to neurologic disease. *Neurobiol Dis* 15:461-473.
- Mattson MP, Culmsee C, Yu Z, Camandola S (2000) Roles of nuclear factor κ B in neuronal survival and plasticity. *J Neurochem* 74:443-456.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. (1997) A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388:394-397.
- Medzhitov R (2001) Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1:135-145.
- Mennini T, Fumagalli E, Gobbi M, Fattorusso C, Catalanotti B, Campiani G (2003) Substrate inhibitors and blockers of excitatory amino acid

- transporters in the treatment of neurodegeneration: critical considerations. *Eur J Pharmacol* 479:291-296.
- Middelhoven PJ, Ager A, Roos D, Verhoeven AJ (1997) Involvement of a metalloprotease in the shedding of human neutrophil Fc gammaRIIIB. *FEBS Lett* 414:14-18.
 - Mollen KP, Anand RJ, Tsung A, Prince JM, Levy RM, Billiar TR (2006) Emerging paradigm: toll-like receptor 4-sentinel for the detection of tissue damage. *Shock* 26:430-437.
 - Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.
 - Moncayo J, de Freitas GR, Bogousslavsky J, Altieri M, van Melle G (2000) Do transient ischemic attacks have a neuroprotective effect? *Neurology* 54:2089-2094.
 - Montaner J (2006) Stroke biomarkers: Can they help us to guide stroke thrombolysis? *Drug News Perspect* 19:523-532.
 - Moro MA, Hurtado O, Cardenas A, Romera C, Madrigal JL, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I (2003) Expression and function of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in the central nervous system. *Neurosignals* 12:53-58.
 - Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. (1997) Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385:733-736.
 - Murphy TH, Schnaar RL, Coyle JT (1990) Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *Faseb J* 4:1624-1633.
 - Murry CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136.
 - Nakajima T, Iwabuchi S, Miyazaki H, Okuma Y, Inanami O, Kuwabara M, Nomura Y, Kawahara K (2002) Relationship between the activation of cyclic AMP responsive element binding protein and ischemic tolerance in the penumbra region of rat cerebral cortex. *Neurosci Lett* 331:13-16.
 - Nakamura M, Nakakimura K, Matsumoto M, Sakabe T (2002) Rapid tolerance to focal cerebral ischemia in rats is attenuated by adenosine A1 receptor antagonist. *J Cereb Blood Flow Metab* 22:161-170.

- Namura S, Maeno H, Takami S, Jiang XF, Kamichi S, Wada K, Nagata I (2002) Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett* 324:117-120.
- Nawashiro H, Tasaki K, Ruetzler CA, Hallenbeck JM (1997) TNF-alpha pretreatment induces protective effects against focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 17:483-490.
- Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia* 50:281-286.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3:216-227.
- Nicoletti F, Bruno V, Catania MV, Battaglia G, Copani A, Barbagallo G, Cena V, Sanchez-Prieto J, Spano PF, Pizzi M (1999) Group-I metabotropic glutamate receptors: hypotheses to explain their dual role in neurotoxicity and neuroprotection. *Neuropharmacology* 38:1477-1484.
- NINDS, (1990) Special report from the National Institute of Neurological Disorders and Stroke. Classification of cerebrovascular diseases III. *Stroke* 21:637-676.
- Nishi S, Taki W, Uemura Y, Higashi T, Kikuchi H, Kudoh H, Satoh M, Nagata K (1993) Ischemic tolerance due to the induction of HSP70 in a rat ischemic recirculation model. *Brain Res* 615:281-288.
- O'Banion MK (1999) Cyclooxygenase-2: molecular biology, pharmacology, and neurobiology. *Crit Rev Neurobiol* 13:45-82.
- O'Neill LA (2004) TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* 25:687-693.
- Ogata T, Nakamura Y, Shibata T, Kataoka K (1992) Release of excitatory amino acids from cultured hippocampal astrocytes induced by a hypoxic-hypoglycemic stimulation. *J Neurochem* 58:1957-1959.
- Ohashi K, Burkart V, Flohe S, Kolb H (2000) Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164:558-561.
- Ohtsuki T, Ruetzler CA, Tasaki K, Hallenbeck JM (1996) Interleukin-1 mediates induction of tolerance to global ischemia in gerbil hippocampal CA1 neurons. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:1137-1142.
- Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, del Zoppo GJ (1994) Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 25:1847-1853; discussion 1853-1844.

- Olney JW, Ho OL (1970) Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 227:609-611.
- Omata N, Murata T, Takamatsu S, Maruoka N, Yonekura Y, Fujibayashi Y, Wada Y (2006) Region-specific induction of hypoxic tolerance by expression of stress proteins and antioxidant enzymes. *Neurol Sci* 27:74-77.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54:581-618.
- Parada CA, Yeh JJ, Joseph EK, Levine JD (2003) Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat. *Eur J Neurosci* 17:1847-1852.
- Park SY, Billiar TR, Seol DW (2002) Hypoxia inhibition of apoptosis induced by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *Biochem Biophys Res Commun* 291:150-153.
- Parvathy S, Karran EH, Turner AJ, Hooper NM (1998) The secretases that cleave angiotensin converting enzyme and the amyloid precursor protein are distinct from tumour necrosis factor-alpha convertase. *FEBS Lett* 431:63-65.
- Pellegrini-Giampietro DE (2003) The distinct role of mGlu1 receptors in post-ischemic neuronal death. *Trends Pharmacol Sci* 24:461-470.
- Perez-Asensio FJ, Hurtado O, Burguete MC, Moro MA, Salom JB, Lizasoain I, Torregrosa G, Leza JC, Alborch E, Castillo J, Knowles RG, Lorenzo P (2005) Inhibition of iNOS activity by 1400W decreases glutamate release and ameliorates stroke outcome after experimental ischemia. *Neurobiol Dis* 18:375-384.
- Persson M, Brantefjord M, Hansson E, Ronnback L (2005) Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. *Glia* 51:111-120.
- Phillis JW, Ren J, O'Regan MH (2000) Transporter reversal as a mechanism of glutamate release from the ischemic rat cerebral cortex: studies with DL-threo-beta-benzyloxyaspartate. *Brain Res* 880:224.
- Pines G, Danbolt NC, Bjoras M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 360:464-467.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B,

- Beutler B (1998) Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282:2085-2088.
- Pulsinelli W (1992) Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* 339:533-536.
 - Qi S, Zhan RZ, Wu C, Fujihara H, Yamakura T, Baba H, Taga K, Shimoji K (2001) Sublethal cerebral ischemia inhibits caspase-3 activation induced by subsequent prolonged ischemia in the C57Black/Crj6 strain mouse. *Neurosci Lett* 315:133-136.
 - Ransom BR, Sontheimer H (1992) The neurophysiology of glial cells. *J Clin Neurophysiol* 9:224-251.
 - Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ (2001) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci* 21:1876-1883.
 - Redford EJ, Smith KJ, Gregson NA, Davies M, Hughes P, Gearing AJ, Miller K, Hughes RA (1997) A combined inhibitor of matrix metalloproteinase activity and tumour necrosis factor-alpha processing attenuates experimental autoimmune neuritis. *Brain* 120 (Pt 10):1895-1905.
 - Robinson MB (1998) The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int* 33:479-491.
 - Roettger V, Lipton P (1996) Mechanism of glutamate release from rat hippocampal slices during in vitro ischemia. *Neuroscience* 75:677-685.
 - Romera C, Hurtado O, Botella SH, Lizasoain I, Cardenas A, Fernandez-Tome P, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA (2004) In vitro ischemic tolerance involves upregulation of glutamate transport partly mediated by the TACE/ADAM17-tumor necrosis factor-alpha pathway. *J Neurosci* 24:1350-1357.
 - Romera C, Hurtado O, Mallolas J, Pereira MP, Morales JR, Romera A, Serena J, Vivancos J, Nombela F, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA (2007) Ischemic preconditioning reveals that GLT1/EAAT2 glutamate transporter is a novel PPARgamma target gene involved in neuroprotection. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1327-1338.
 - Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:360-366.
 - Rosenberg GA (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia* 39:279-291.

- Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, Meller R, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2007) Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNF α after stroke: a novel role for TNF α in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:1663-1674.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 403:316-321.
- Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D, Nash N, Kuncl RW (1994) Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 13:713-725.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675-686.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature* 433:73-77.
- Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Carpen O, Siren A (2001) Differential cellular expression of tumor necrosis factor- α and Type I tumor necrosis factor receptor after transient global forebrain ischemia. *J Neurol Sci* 186:87-99.
- Samdani AF, Dawson TM, Dawson VL (1997) Nitric oxide synthase in models of focal ischemia. *Stroke* 28:1283-1288.
- Schaller B, Graf R (2002) Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? *J Neurol* 249:1503-1511.
- Schiffer D, Giordana MT, Migheli A, Giaccone G, Pezzotta S, Mauro A (1986) Glial fibrillary acidic protein and vimentin in the experimental glial reaction of the rat brain. *Brain Res* 374:110-118.
- Schneider GH, Baethmann A, Kempfski O (1992) Mechanisms of glial swelling induced by glutamate. *Can J Physiol Pharmacol* 70 Suppl:S334-343.
- Schroeter M, Kury P, Jander S (2003) Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice. *Brain Res Mol Brain Res* 117:1-7.
- Seal RP, Amara SG (1998) A reentrant loop domain in the glutamate carrier EAAT1 participates in substrate binding and translocation. *Neuron* 21:1487-1498.

- Seal RP, Amara SG (1999) Excitatory amino acid transporters: a family in flux. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39:431-456.
- Seki Y, Feustel PJ, Keller RW, Jr., Tranmer BI, Kimelberg HK (1999) Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke* 30:433-440.
- Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-1197.
- Shamloo M, Wieloch T (1999) Changes in protein tyrosine phosphorylation in the rat brain after cerebral ischemia in a model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:173-183.
- Sheldon AL, Robinson MB (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int* 51:333-355.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Brain Res Rev* 45:250-265.
- Shimazaki K, Ishida A, Kawai N (1994) Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci Res* 20:95-99.
- Shimizu S, Nagayama T, Jin KL, Zhu L, Loeffert JE, Watkins SC, Graham SH, Simon RP (2001) bcl-2 Antisense treatment prevents induction of tolerance to focal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:233-243.
- Shohami E, Ginis I, Hallenbeck JM (1999) Dual role of tumor necrosis factor alpha in brain injury. *Cytokine Growth Factor Rev* 10:119-130.
- Skovronsky DM, Fath S, Lee VM, Milla ME (2001) Neuronal localization of the TNFalpha converting enzyme (TACE) in brain tissue and its correlation to amyloid plaques. *J Neurobiol* 49:40-46.
- Smalley DM, Ley K (2005) L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage. *J Cell Mol Med* 9:255-266.
- Stenzel-Poore MP, Stevens SL, Xiong Z, Lessov NS, Harrington CA, Mori M, Meller R, Rosenzweig HL, Tobar E, Shaw TE, Chu X, Simon RP (2003) Effect of ischaemic preconditioning on genomic response to cerebral ischaemia: similarity to neuroprotective strategies in hibernation and hypoxia-tolerant states. *Lancet* 362:1028-1037.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:10955-10959.

- Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, Fisher PB (2003) Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1955-1960.
- Szatkowski M, Attwell D (1994) Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci* 17:359-365.
- Szymocha R, Akaoka H, Dutuit M, Malcus C, Didier-Bazes M, Belin MF, Giraudon P (2000) Human T-cell lymphotropic virus type 1-infected T lymphocytes impair catabolism and uptake of glutamate by astrocytes via Tax-1 and tumor necrosis factor alpha. *J Virol* 74:6433-6441.
- Takahashi M, Billups B, Rossi D, Sarantis M, Hamann M, Attwell D (1997) The role of glutamate transporters in glutamate homeostasis in the brain. *J Exp Biol* 200:401-409.
- Tanaka H, Calderone A, Jover T, Grooms SY, Yokota H, Zukin RS, Bennett MV (2002) Ischemic preconditioning acts upstream of GluR2 down-regulation to afford neuroprotection in the hippocampal CA1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2362-2367.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276:1699-1702.
- Tang SC, Arumugam TV, Xu X, Cheng A, Mughal MR, Jo DG, Lathia JD, Siler DA, Chigurupati S, Ouyang X, Magnus T, Camandola S, Mattson MP (2007) Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:13798-13803.
- Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV (1993) Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J Biol Chem* 268:18542-18548.
- Tasaki K, Ruetzler CA, Ohtsuki T, Martin D, Nawashiro H, Hallenbeck JM (1997) Lipopolysaccharide pre-treatment induces resistance against subsequent focal cerebral ischemic damage in spontaneously hypertensive rats. *Brain Res* 748:267-270.
- Tower DB, Young OM (1973) The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *J Neurochem* 20:269-278.

- Toyoda T, Kassell NF, Lee KS (1997) Induction of ischemic tolerance and antioxidant activity by brief focal ischemia. *Neuroreport* 8:847-851.
- Tsubokawa H, Oguro K, Masuzawa T, Kawai N (1994) Ca(2+)-dependent non-NMDA receptor-mediated synaptic currents in ischemic CA1 hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 71:1190-1196.
- Turman MA, Kahn DA, Rosenfeld SL, Apple CA, Bates CM (1997) Characterization of human proximal tubular cells after hypoxic preconditioning: constitutive and hypoxia-induced expression of heat shock proteins HSP70 (A, B, and C), HSC70, and HSP90. *Biochem Mol Med* 60:49-58.
- Vane JR, Botting RM (1998) Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *Int J Tissue React* 20:3-15.
- Verma IM, Stevenson JK, Schwarz EM, Van Antwerp D, Miyamoto S (1995) Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation. *Genes Dev* 9:2723-2735.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10:45-65.
- Waltenberger J, Kranz A, Beyer M (1999) Neovascularization in the human heart is associated with expression of VEGF-A and its receptors Flt-1 (VEGFR-1) and KDR (VEGFR-2). Results from cardiomyopexy in ischemic cardiomyopathy. *Angiogenesis* 3:345-351.
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5510-5514.
- Wang X, Li X, Erhardt JA, Barone FC, Feuerstein GZ (2000) Detection of tumor necrosis factor-alpha mRNA induction in ischemic brain tolerance by means of real-time polymerase chain reaction. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:15-20.
- Wegener S, Gottschalk B, Jovanovic V, Knab R, Fiebach JB, Schellinger PD, Kucinski T, Jungehulsing GJ, Brunecker P, Muller B, Banasik A, Amberger N, Wernecke KD, Siebler M, Rother J, Villringer A, Weih M (2004) Transient ischemic attacks before ischemic stroke: preconditioning the human brain? A multicenter magnetic resonance imaging study. *Stroke* 35:616-621.
- Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, Einhaupl KM (1999) Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke* 30:1851-1854.
- Wilson CJ, Finch CE, Cohen HJ (2002) Cytokines and cognition--the case for a head-to-toe inflammatory paradigm. *J Am Geriatr Soc* 50:2041-2056.

- Wu C, Zhan RZ, Qi S, Fujihara H, Taga K, Shimoji K (2001) A forebrain ischemic preconditioning model established in C57Black/Crj6 mice. *J Neurosci Methods* 107:101-106.
- Yamaguchi K, Yamaguchi F, Miyamoto O, Hatase O, Tokuda M (1999) The reversible change of GluR2 RNA editing in gerbil hippocampus in course of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* 19:370-375.
- Yang W, Kilberg MS (2002) Biosynthesis, intracellular targeting, and degradation of the EAAC1 glutamate/aspartate transporter in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 277:38350-38357.
- Ye ZC, Sontheimer H (1996) Cytokine modulation of glial glutamate uptake: a possible involvement of nitric oxide. *Neuroreport* 7:2181-2185.
- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB (1993) Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 342:276-277.
- Zemke D, Smith JL, Reeves MJ, Majid A (2004) Ischemia and ischemic tolerance in the brain: an overview. *Neurotoxicology* 25:895-904.
- Zhang FY, Chen XC, Ren HM, Bao WM (2006) Effects of ischemic preconditioning on blood-brain barrier permeability and MMP-9 expression of ischemic brain. *Neurol Res* 28:21-24.
- Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH (1994) Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 263:687-689.
- Zhang ZG, Zhang L, Jiang Q, Zhang R, Davies K, Powers C, Bruggen N, Chopp M (2000) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106:829-838.
- Zlokovic BV (2006) Remodeling after stroke. *Nat Med* 12:390-391.
- Zuany-Amorim C, Hastewell J, Walker C (2002) Toll-like receptors as potential therapeutic targets for multiple diseases. *Nat Rev Drug Discov* 1:797-807.
- Zúkin et al., (2004) *Stroke. Pathophysiology, Diagnosis and Management* 4ª edición. Ed. Churchill livingstone; 42, 829-854.